

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN



**SKLADOVÁNÍ A TRANSPORT mRNA V ROSTLINNÝCH
BUŇKÁCH**

mRNA STORAGE AND TRANSPORT IN PLANT CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Peter Darivčák

Školitel: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha 2016

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc během vypracovávání této práce.

Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům za vše, co pro mě dělali, Michaelle Mojžišové za neustálou podporu, a Pavlu Bokvajovi za cenné rady.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením vedoucího bakalářské práce.

V Praze, dne 12. května 2016

Peter Darivčák

Abstrakt

Transport mRNA do cílových kompartmentů buňky a případně její skladování, či už krátkodobé nebo dlouhodobé, je nedílnou součástí vývoje organismů. Těchto procesů se využívá k časoprostorové organizaci translace v buňce a nastávají především během embryogeneze a u rostlin při vývoji semen a gametofytů, ale také během stresového zatížení organismu, kdy dochází ke snížení produkce proteinů a potřebě uchovat již vytvořené transkripty. U systémů s nutností okamžitého rychlého růstu je skladování mRNA nepostradatelné, neboť není nutné vytvářet nové transkripty a transportovat je na místo určení, co značně urychluje syntézu proteinů a umožňuje růst jakmile to okolnosti dovolí.

Tato rešerše si klade za cíl vysvětlit mechanismy transportu mRNA v rostlinných buňkách, tedy jakým způsobem a kterými faktory je pohyb mRNA buňkou zprostředkován, popsat případy, kdy byla mRNA transportována a lokalizovaně skladována a úpravy pre-mRNA, které celému procesu předcházejí. Kromě popisu jevů jsem se zaměřil hlavně na hledání rostlinných ortologních proteinů účastnících se transportu a stability mRNA, které jsou jinak všeobecně známy u živočichů nebo kvasinek.

Klíčová slova

mRNA, mRNP, zrání pre-mRNA, transport mRNA, skladování mRNA, rostliny, embryogeneze

Abstract

Transport of mRNA molecules to certain regions within the cell and short-term or long-term storage of transcripts are integral processes in development of organisms. These processes are utilized for temporal and spatial organisation of translation in the cell and appears mainly during embryogenesis and plant seed or gametophyte development, but also during stress, when overall proteosynthesis is reduced and need for keeping transcripts occurs. Storage of mRNA is crucial step in systems which depends on immediate and fast growth, because in that case, there is no need to produce new mRNA and whole process of proteosynthesis is accelerated when in need.

Objective of this review is explanation of mechanisms responsible for transport of mRNA in plant cells, how the process is mediated and which proteins are involved and describe cases in which mRNA was transported, localised and stored. Part of the work is dedicated to pre-mRNA processing, foregoing process determining the fate of mRNA, and search for plant ortholog proteins involved in transport and stability of mRNA, which are commonly known in animals and yeast.

Key words

mRNA, mRNP, pre-mRNA processing, mRNA transport, mRNA storage, plants, embryogenesis

Obsah

1. Úvod	5
2. Skládání mRNP částic v jádře.....	6
2.1 Úpravy pre-mRNA.....	6
2.1.1 Syntéza čepičky.....	6
2.1.2 Sestřih pre-mRNA	7
2.1.3 Regulace sestřihu u rostlin	8
2.1.4 Polyadenylace.....	9
2.2 Složení mRNP.....	10
2.2.1 hnRNP a další RBP vázané během transkripce	10
2.2.2 Poly(A) vazebné proteiny (PABP)	11
3. Jaderný export mRNP	13
3.1 Rostlinný komplex jaderného póru	13
3.2 Translokace mRNP komplexem jaderného póru.....	15
4. Transport mRNA cytoplazmou	18
4.1 Složení mRNP a transport buňkou.....	18
4.1.1 <i>Cis</i> - elementy mRNA - zip kódy.....	18
4.1.2 Transportní komplexy a způsoby transportu u eukaryot	19
4.2 Transport mRNA u rostlin.....	22
4.3 Lokalizace mRNA u rostlin	23
5. Skladování mRNA	26
5.1 Processing bodies	26
5.2 Stresové granule.....	27
5.3 Translačně inaktivované mRNP a EPPs.....	28
Závěr	31
Seznam použité literatury	32

1. Úvod

Stavební bloky všech živých organismů, proteiny, se neprodukují přímo podle DNA, nýbrž informace o sekvenci genu je zprostředkována molekulami mRNA (z angl. Messenger ribonucleic acid). Geny v DNA jsou nejprve přepsány do molekul mRNA a teprve zralá mRNA opatřená požadovanými proteiny je překládána do sekvence aminokyselin. Přepis genů do mRNA umožňuje správný vývoj organismu. Pokud by byly proteiny syntetizovány přímo dle DNA a vyskytla by se při procesu nějaká chyba, nedalo by se vyhnout tvorbě poškozeného proteinu a to by mohlo vést k deformaci organismu a případně k jeho úhynu, což je evolučně velmi nevýhodné. Jestliže ale informaci zprostředkovává molekula, která v případě defektu může být degradována aniž by byly ohroženy buněčné procesy organismu, lze mnoha chybám předejít.

Během vývoje života se buňky neustále vyvíjely a začaly vykazovat dělení svého obsahu do specializovaných kompartmentů. Vystala potřeba produkovat specifické proteiny v určitých kompartmentech buňky. Protože eukaryotické buňky mohou být až řádově větší než prokaryotické, doprava proteinů do místa určení by mohla být zdoluhavá a náročná. To se nehodí především rychle rostoucím organismům, jejichž růst může být závislý na specifických podmínkách, které nenastávají příliš často, a proto využívají aktivního transportu předpřipravené mRNA do oblasti aktivního růstu, nebo kamkoliv, kde to procesy vývoje organismu vyžadují. Tam může být mRNA v případě nevhodných podmínek skladována a poté, co vlastnosti prostředí umožní růst, jsou tyto mRNA rekrutovány na ribozómy a překládány do sekvence aminokyselin. Typickým příkladem je růst pylové láčky, který nastává téměř okamžitě po hydrataci. Pylová láčka potřebuje v co nejkratším časovém horizontu dosáhnout semeníku, proto spoléhá na transkripty připravené během vývoje pylového zrna, uchovává je v tzv. mRNP (z angl. Messenger ribonucleoprotein) částicích (Honys a kol. 2009) a v případě, že nastanou vhodné podmínky, je pylová láčka připravena k okamžitému rychlému růstu. Do míst, kde je mRNP skladován, je dopraven aktivním transportem mechanismem, který je u rostlin popsán značně méně, než u živočichů nebo kvasinek.

V této práci se soustředím na hledání mechanismů zprostředkovávajících aktivní transport mRNA u rostlin (a to nejen v cytoplazmě, ale i při exportu z jádra) a co transportu předchází. Dále má pozornost směřovala k porovnání účastníků se proteinů se známými faktory ze savců a kvasinek a na případy, kdy byla mRNA lokalizována.

2. Skládání mRNP částic v jádře

Transkribovaná mRNA se v buňkách nevyskytuje jako samotná molekula, ale již během transkripce je na vznikající nascentní řetězec rekrutováno mnoho RNA vazebných proteinů (RBP) zodpovídajících za zrání mRNA, export z jádra a určení následného osudu transkriptu v cytoplazmě. Vznikají tak tzv. mRNP komplexy.

2.1 Úpravy pre-mRNA

2.1.1 Syntéza čepičky

Většina procesů zpracování pre-mRNA – čepičkování, sestřih a polyadenylace, je spjata s transkripcí a probíhá během, nebo bezprostředně po ní. Ve vyšších eukaryotech je již během transkripce C-terminální doména (CTD) fosforylovaná na Ser-5 velké podjednotky RNA polymerázy II (RNAPII) zodpovědná za navázání enzymů zodpovědných za vytvoření m⁷G čepičky (Cho a kol. 1997). K syntéze čepičky dochází po syntéze více než 20 nukleotidů (Copolla a kol. 1983) a během pozastavení transkripčního aparátu, které zajišťuje NELF (z angl. Negative elongation factor) ve spolupráci s DSIF (Yamaguchi a kol. 1999). Transkripce je následně znovu spuštěna fosforylací CTD na Ser-2 pozitivním elongačním faktorem b (P-TEF b) (Marshall a Price 1995) a uvolněním elongačních represorů NELF/DSIF. Struktura čepičky blokuje aktivitu 5'-3' exoribonukleáz, a tedy zpomaluje následnou degradaci mRNA: slouží také ke zprostředkování interakce 5' konce transkriptu s jeho 3' koncem (Gallie 1991) prostřednictvím Cap vazebného komplexu (CBC). Další úlohou CBC je usnadnění rozeznání prvního intronu při sestřihu pre-mRNA. CBC se skládá ze dvou podjednotek, CBP20, čepičku vázajícího proteinu, a CBP80, který zajišťuje vysokoafinitní vazbu a asociuje s CTD (Lejeune a kol. 2002). Vazba čepičky a na ní vázících se proteinů je prvním krokem tvorby stabilních, transportu a následné translace nebo skladování schopných mRNP.

CBP20 a CBP80 byly popsány i v rostlinách (Kmieciak a kol. 2002), zatím ale není známo, zda rostlinný CBC také usnadňuje rozeznání 5' sestřihového místa na prvním intronu pro U1 snRNP tak, jako je tomu v kvasinkách.

U *Arabidopsis thaliana* byla naproti tomu prokázána funkce CBP20 a CBP80 při odpovědi na stres zasolením. Mutanti v těchto proteinech vykazovali sníženou odolnost

proti zasolení a u dvojitéch mutantů v *cbp20/80* se objevovalo více defektních fenotypů (Kong a kol. 2014).

2.1.2 Sestřih pre-mRNA

I další úpravy mRNA jsou pro její správnou funkci nezbytností, mezi tyto v základu patří vystřížení intronů a polyadenylace. Introny naprosté většiny genů jsou vystříženy také kotranskripčně v asociaci s CTD při procesu zvaném sestřih za účasti komplexní ribonukleoproteinové částice, spliceosomu. Sestavení spliceosomu vyžaduje spotřebu ATP a na tomto procesu se podílejí různé druhy proteinů, jako jsou RNA vazebné proteiny, RNA dependentní ATPázy, RNA helikázy a protein kinázy. Jsou známy dva typy spliceosomů, typ U2 (velký) a typ U12 (malý), nacházející se jak u obratlovců, tak u rostlin. Velké spliceosomy jsou sestavovány na každém jednotlivém intronu a skládají se z U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP, zatímco malé spliceosomy jsou složeny ze sedmi typů U11/U12 snRNP a vystřihují pouze introny typu U12 (Xu a kol. 2016). U eukaryot dochází ke skládání spliceosomů záhy po vytvoření čepičky, kdy se hnRNP bohaté na uridylyát (konkrétně U1 snRNP) (Kotovic a kol. 2003) váží na nejbližší 5' sestřihové místo a iniciují stavbu sestřihového aparátu na proximálním intronu (Aguilera 2005). U rostlin má tuto funkci protein U1-70K (Golovkin a Reddy 1996). U2 snRNP se poté váže na místo větvení intronu, asociují U4/U6.U5 tri-snRNP, dojde k vyvázání U1 snRNP, čímž vznikne katalytický komplex (Burge a kol. 1999). U-snRNP rostlin vykazují podobnosti v primární i sekundární struktuře (Solymosy a Pollák 1993) a mezi vyššími rostlinami jsou konzervované (Solymosy a Pollák 1993; Simpson a kol. 1995; Golovkin a Reddy 1996). V komplexu U4/U6.U5 tri-snRNP bylo identifikováno sedm Sm proteinů vázaných na U4 a U5 snRNP, sedm Lsm (z angl. Sm-like) vázaných na U6 snRNP a 16 dalších, především několik Prp proteiny sloužící jako lešení pro stavbu komplexu (konkrétně Prp8), RNA helikáza Brr2 a GTPáza Snu114, a tyto proteiny jsou dohromady základními komponentami pro vytvoření aktivního katalytického komplexu (Agafonov a kol. 2016). U *Arabidopsis thaliana* byla experimentálně potvrzena existence pěti snRNA: U1, U2, U4, U5 a U6 (Vankan a kol. 1988; Vankan a Filipowicz 1988; Waibel a Filipowicz 1990; Marshallsay a kol. 1990; Hofmann a kol. 1992; Golovkin a Reddy 1996). Za transkripci U1, U2, U4 a U5 zodpovídá RNA polymeráza II a za transkripci U6 RNA polymeráza III.

Funkce složek U snRNP nemusí být pouze při sestřihu. U rostlin byla pozorována funkce RDM16 (protein asociovaný s U4/U6.U5 snRNP) při RdDM (z angl. RNA-directed DNA methylation) (Huang a kol. 2013).

Další důležitou součástí spliceosomů jsou na serin a arginin bohaté SR fosfoproteiny, které se váží na určité intronové nebo exonové motivy a současně na ostatní proteiny spliceosomu. Patří mezi proteiny, které zůstávají asociovány s mRNA jako součást mRNP částice, proto jejich podoba a funkce budou rozebrány v kapitole 2.2.1.

Proces vystřížení intronů sestává ze dvou transesterifikačních reakcí. Kvůli stejnému složení spliceosomů jako u ostatních eukaryot lze předpokládat, že sestřih mRNA v rostlinách využívá stejných procesů. V první reakci dochází ke štěpení na hranici intronu z 5' konce, vazby 5'-fosfátu na 2'-hydroxylovou skupinu nukleotidů místa větvení a následného vzniku struktury lasa, neboli lariátu. V druhém kroku je rozhraní intron-exon štěpeno na 3' sestřihovém místě, čímž dochází k disociaci lariátu a příslušné exony jsou následně ligovány k sobě. Posestřihový komplex z U2, U4, U5 a U6 snRNP je rozložen a snRNP jsou recyklovány, lasová struktura intronu je oddělena a degradována. Po sestřihu je na mRNA ve vzdálenosti 20-24 nukleotidů proti proudu od spoje ponechán exon-exon multiproteinový komplex zvaný EJC (z angl. exon junction complex) sestávající z alespoň šesti proteinů. Složky EJC mají funkci v následných procesech jako je export mRNA z jádra do cytoplasmy, lokalizace v cytoplasmě a NMD (z angl. Nonsense-mediated mRNA decay) (Dreyfuss a kol. 2002; Maquat 2004).

Ač většina spliceosomálních proteinů vykazuje mezi eukaryoty řadu podobností, u rostlin má rozlišení intronů a sestřihových míst své unikátní vlastnosti. Introny rostlin jsou kratší než u savců a jsou bohaté na dinukleotidy AU (viz Morello a Breviario 2008).

2.1.3 Regulace sestřihu u rostlin

Kromě sestřihových faktorů popsaných výše (SR proteiny a U-snRNP) se na sestřihu podílejí také sestřihové regulátory. Některé mohou usnadňovat sestřih, modifikovat sestřihové faktory, jiné mohou mít na sestřih negativní dopad. V rostlinách bylo identifikováno více regulátorů než například u savců (Wang a Brendel 2004). Jedním z regulátorů je hnRNP protein, který se dokáže vázat na pre-mRNA a blokovat vazebné místo pro sestřihové faktory (Wang a Brendel 2004). Například, mezi PTB/hnRNP I (Polypyrimidine tract binding protein) a U2AF (U2 snRNP auxiliary factor) dochází ke kompetici na 3' sestřihovém místě. Zatímco PTB inhibuje sestřih intronů

obsahujících vazebné místo pro tento faktor, U2AF se chová jako antagonist a efekt PTB redukuje (Lin a Patton 1995). V *Arabidopsis* byly identifikovány tři homology PTB/hnRNP a dvacet jedna RNA vazebných proteinů bohatých na glycin (homology lidských hnRNP A1 a hnRNP A2/B1) (Wang a Brendel 2004). Dále bylo popsáno 15 hnRNP-like proteinů, pravděpodobně specifických pro rostliny (Lambermon a kol. 2000; Lorković a kol. 2000; Landsberger a kol. 2002; Wang a Brendel 2004). Pro příklad, hnRNP-like protein UB1 skoro dvojnásobně zesiluje sestřih některých intronů v protoplastech (Lambermon a kol. 2000). Za regulaci jsou zodpovědné také SR protein kinázy, u nichž byla prokázána schopnost fosforylovat SR proteiny. Jednou z nich je Clk/Sty protein kináza (AFC-2) z *Arabidopsis* (Golovkin a Reddy 1999). Sekvence SR protein kináz jsou mezi rostlinami vysoce konzervované, což napovídá o důležitosti funkce těchto proteinů. V *Arabidopsis* bylo popsáno osm homologů odpovídajících třem savčím (Wang a Brendel 2004).

Regulaci zprostředkovávají nejenom regulátory interagující se sestřihovými faktory, ale mohou se na ní podílet také rostlinné hormony. Hormony jako ABA nebo IAA jsou schopny pozměnit alternativní sestřih genů pro SR proteiny, kdy záleží na konkrétní tkáni a fázi vývoje, ačkoliv jsou RS geny exprimovány ve všech orgánech. Také teplota či zasolení mohou mít vliv na alternativní sestřih některých genů kódujících SR proteiny (Palusa a kol. 2007) a tím se podílet na sestřihu ostatních transkriptů.

2.1.4 Polyadenylace

Posttranskripční přidání polyadeninového řetězce (poly(A)) na konec pre-mRNA je dalším klíčovým krokem k udržení její životnosti a způsobilosti k translaci. Ačkoliv její funkce je nejvíce zřetelná při setrvávání mRNA v cytoplazmě, byla prokázána i kooperace polyadenylačních faktorů s CTD RNA polymerázy II při terminaci transkripce (McCracken a kol. 1997) a další studie poukazují na fakt, že polyadenylace hraje důležitou přípravu pro export z jádra, neboť transkripty, jejichž 3' konec není po štěpení upravený polyadenylací, nejsou exportu schopny (Huang a Carmichael 1996). Na poly(A) řetězec se váží poly(A) vazebné proteiny (PABP) hrající důležitou roli v tvorbě mRNA, její stabilitě, transportu a kontrole translace. Blíže budou typy a funkce PABP, jakožto faktorů účastnících se transportu, popsány v podkapitole 2.2.2.

Proces polyadenylace je závislý na *cis*-elementech, neboli polyadenylačním signálu pre-mRNA, a trans-faktorů, jejichž rolí je sestřih a adice poly(A) řetězce na 3'konec. U savců tyto faktory rozeznávají jako signál pro polyadenylaci sekvenci

AAUAAA ležící proti proudu od sestřihového/polyadenylačního místa a po proudu ležící element bohatý na UG (Gupta a kol 1995). Rostlinný polyadenylační signál nacházející se v 3' nepřekládaném regionu je rozdělen do tří hlavních skupin. Prvním je 60-100 nukleotidů dlouhý FUE (z angl. Far upstream element), kontrolní a posilující prvek sestávající z UG motivu a sekvence UUGUAA (Hunt 1994). Dalším je místo štepení (CS, z angl. Cleaving site) YA dinukleotid (CA nebo UA) nacházející se blízko regionu bohatého na U a NUE (z angl. Near upstream element), který je dlouhý 6-10 nukleotidů a leží mezi 13.-30. nukleotidem proti proudu od CS. V okolí a skrz CS mezi pozicí -10 a +15 nukleotidů byly objeveny 6 nukleotidové vzory tvořící signální element, který dosud nebyl v rostlinách popsán. Tento signální prvek byl nazván Cleavage element (CE) (Loke a kol. 2005). Ve stejné práci je diskutována také pravděpodobná existence pro rostliny unikátních sekundárních struktur sloužících jako poly(A) signál. Signální element na 3' konci, kde je pre-mRNA sestřižena, rozeznává CPSF (z angl. Cleavage and polyadenylation specificity factor). Byla prokázána také funkce CPSF při alternativní sestřihu (Misra a kol 2015).

Polyadenylační reakce je katalyzována poly(A) polymerázou (PAP) a probíhá ve dvou krocích. První vyžaduje polyadenylační signál a je při něm přidáno přibližně 10 nukleotidů na molekulu pre-mRNA. Při druhém kroku dochází k adici dalších zhruba 50 nukleotidů (u *Arabidopsis*) (Subtelny a kol. 2014).

2.2 Složení mRNP

2.2.1 hnRNP a další RBP vázané během transkripce

Heterogenní jaderné ribonukleoproteiny (hnRNP) jsou převážně jaderné, RNA-vazebné proteiny, které se váží na pre-mRNA syntetizovanou RNA polymerázou II. Jejich funkce se uplatňují v širokém spektru buněčných aktivit od transkripce a zrání pre-mRNA (především sestřihu), po translaci a dynamickou rovnováhu mRNA. HnRNP se skládají ze šesti základních proteinů v mnoha kopiích, které se váží na heterogenní jadernou RNA (hnRNA). Charakteristickým znakem hnRNP je přítomnost RNA rozeznávajícího/vazebného motivu, díky kterému se váže na vznikající pre-mRNA, a podpůrné domény, která zprostředkovává protein-proteinové interakce. hnRNP mohou usnadňovat sestřih pre-mRNA vazbou SR proteinů, nebo jej naopak inhibovat způsobem, jenž byl popsán v kapitole 2.1.3. Jak již bylo zmíněno, u rostlin byly popsány homology savčích hnRNP a navíc ještě patnáct hnRNP-like proteinů, které mohou

výrazně usnadňovat sestřih pre-mRNA (Lambermon a kol. 2000). hnRNP lze dělit do dvou skupin, na hlavní (major) a vedlejší (minor). Hlavními jsou hnRNP A, hnRNP A/B, hnRNP C1/C2, hnRNP F, hnRNP H a hnRNP I/polypyrimidine-vazebný protein. Mezi vedlejší patří HnRNP K, hnRNP A0 a CUG RNA vazebný protein 1 (Yeap a kol. 2014). Ačkoliv jsou některé hnRNP z mRNA vyvazovány, další zůstávají součástí mRNP a doprovázejí mRNA až do cytoplazmy. U savců byla jejich role v exportu z jádra prokázána na hnRNP A1, jenž obsahuje M9 doménu, která je zároveň exportním signálem. HnRNP A1 se také účastní sbalování pre-mRNA do mRNP (string-db.org) a byl identifikován při vazbě na 3'UTR motiv sloužící k cílení transkriptu k degradaci, tedy může se podílet i na kontrole stability mRNA (Geissler a kol. 2016).

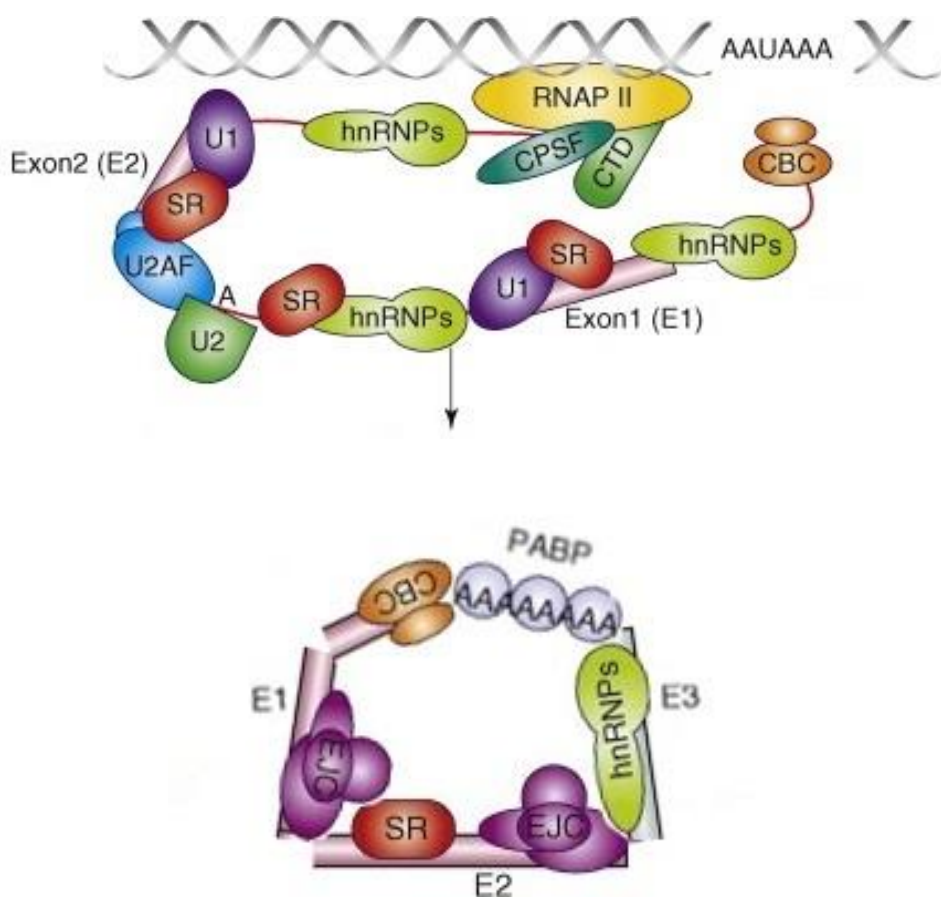
Mnoho hnRNP je z mRNA odstraněno během vystřížení intronů (viz kompetice PTB/hnRNP 1 a U2AF v kapitole 2.1.3). Lin a Patton (1995) také poukazují na schopnost U2AF přemístit PTB, což by znamenalo, že struktura mRNP je do určité míry dynamická. Některé hnRNP jako například již zmíněný hnRNP A1 však zůstávají a spolu s EJC doprovázejí mRNA do cytoplazmy. EJC je ponechán sestřihovým aparátem po vystřížení intronů a ligaci exonů. Jedním z šesti proteinů tvořících EJC, které jsou stejné jak u savců, tak u rostlin, je ALY (často uváděn také jako ALY/REF)- adaptér pro exportní receptory, což vede k účasti EJC na exportu mRNA z jádra. Dalšími jsou Mago-nashi, Y14 (Tsunagi), UAP56 helikáza (u rostlin zřejmě AT2G33730; string-db.org) RNPS1 a eukaryotický iniciační faktor eIF4A-III.

Dalšími proteiny mRNP partikule doprovázejícími mRNA do cytoplazmy jsou SR fosfoproteiny, součástí sestřihového komplexu. Jsou esenciálním faktorem pro rozeznání sestřihových míst a sestavení sestřihového aparátu. Skládají se z jednoho nebo dvou N-terminálních RRM (z angl. RNA recognition motif) a C-terminální domény bohaté na serin a arginin. V rostlinách bylo popsáno více SR fosfoproteinů, než například u člověka (10) a to 19 u *Arabidopsis* (Wang a Brendel 2004) a až 24 u rýže, kódovaných 20 geny (Isshiki a kol. 2005).

2.2.2 Poly(A) vazebné proteiny (PABP)

Eukaryotické poly(A) vazebné proteiny (PABP) jsou esenciální a velice hojné buněčné faktory obsahující RRM (z angl. RNA-recognition motif) účastnící se tvorby mRNA, translace, především její iniciace, a transportu. Váží se na polyadenylovaný 3' konec mRNA a později také interagují s cap vazebným komplexem (CBC) a eIF4G/eIF4B iniciačními faktory translace. Udržují stabilitu mRNA inhibicí deadenylace a

odčepičkování (Wilusz a kol. 2001) a hrají roli i v exportu (Chekanova a Belostotsky 2003). Zatímco savci a kvasinky mají většinou pouze jeden nebo jenom pár PABP, u rostlin jich lze najít až osm (PAB1-8) a dělí se dle fylogeneze do tří skupin. PABP první třídy (PAB3,5) jsou strukturou stejné jako PABP druhé třídy (PAB2,4,8), rozdíl je pouze v absenci intronu 2 a 12 u druhé třídy. Třetí třída PABP (PABP6 a PABP7) sdílí společné introny 3, 4 a 9, které v ostatních nejsou. PAB1 nepatří do žádné z výše uvedených skupin. PABP první a druhé třídy se vyvinuly ze společného ancestrálního PABP genu ztrátou několika intronů, třetí třída se vyvinula nezávisle od výše zmíněných ztrátou intronu 6 a 8. Jejich exprese může a nemusí být orgánově specifická, například PAB3 a PAB5 jsou exprimovány především v reprodukčních orgánech, konkrétně ve vegetativní a generativní buňce samčího gametofytu, ale PAB2 a PAB4 jsou silně exprimovány v celé rostlině (Belostotsky 2003).



Obr. 1. Pre-mRNA s navázanými proteiny a složená jaderná mRNP částice.
(upraveno dle Lorković 2009)

3. Jaderný export mRNP

Poté, co je pre-mRNA zpracována čepičkováním, sestřihem, polyadenylací, opatřena náležitými komplexy proteinů a úspěšně sbalena do mRNP částice, musí cestou do cytoplazmy projít skrze jadernou membránu. mRNP jsou translokovány skrze komplex jaderného póru a proces exportu z jádra se účastní jak komponenty mRNP, tak různé exportní faktory, které interagují s doménami jaderných pórů a současně s mRNP, popřípadě mění jeho strukturu. Souhra proteinových komplexů účastnících se exportu povede k rozvinutí mRNP, translokaci komplexem jaderného póru a umožnění mRNP být transportován na místo určení.

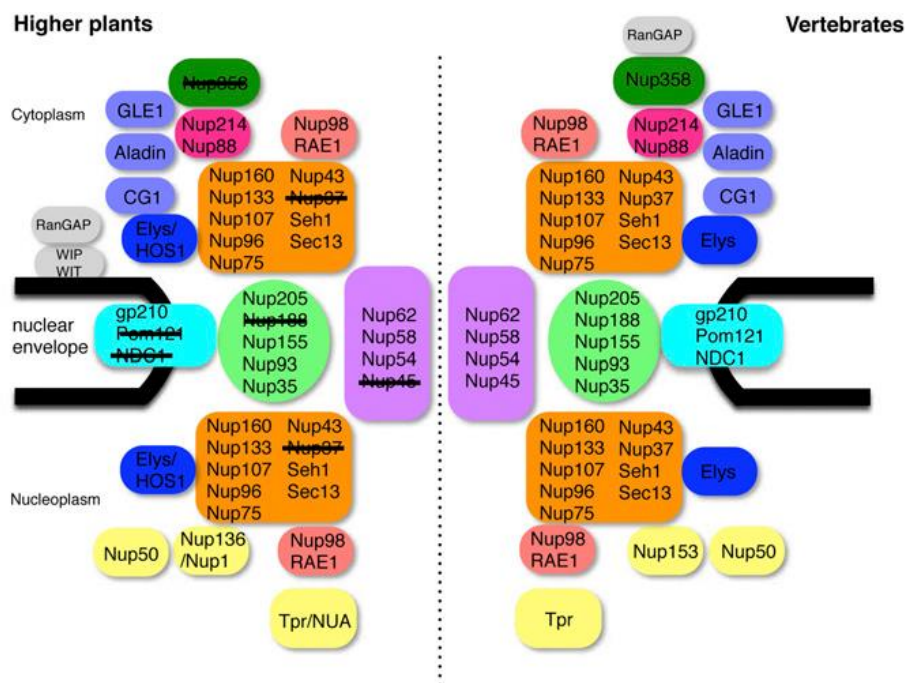
3.1 Rostlinný komplex jaderného póru

Komplex jaderného póru (NPC-z angl. Nuclear pore complex) je velký, 60 (u kvasinek) – 120 (u savců a rostlin) MDa proteinový komplex (Parry 2014) spojující vnitřní a vnější jadernou membránu a je klíčovým regulátorem transportu proteinů a RNA mezi jádrem a cytoplazmou. Stavebními bloky jaderného póru jsou proteiny Nup (nukleoporiny), které jsou v komplexu v mnoha kopiích hojně zastoupeny. Celkový počet nukleoporinů na jaderný pór je přibližně 500-1000 (Cronshaw a kol. 2002). U rostlin bylo identifikováno, stejně jako u savců a kvasinek, 30 Nup proteinů, přičemž u rostlin chybělo sedm komponent jaderného póru v porovnání se savčím. Nicméně, byl identifikován Nup136/Nup1 obsahující phenylalanine (F)-Glycín (G) repetice, jehož homolog u savců nebyl zjištěn (Tamura a kol. 2010). U nukleoporinu MOS7/Nup88 byla zjištěna důležitá role při gametogenezi a vývoji semen *Arabidopsis*. Mutace v alele *mos7-5* způsobuje zastavení vývoje zárodečného vaku a pylu (Park a kol. 2014). Také LNO1 (u lidí Nup214), který zprostředkovává vazbu s mRNA exportními faktory se ukázal být nezbytným. Mutace v genu pro tento nukleoporin zastavuje první asymetrické dělení během rané embryogeneze, to vede k zastavení vývoje embrya (Braud a kol. 2012). Rostlinné nukleoporiny vykazují podobnou organizaci domén jako nukleoporiny savců a kvasinek, ale homologie sekvence Nups je vyšší mezi rostlinami a savci (Tamura a kol. 2010). Dalším rozdílem u rostlinného NPC je absence Nup358, nukleoporinu kotvícího RanGAP (z angl. RanGTP-activating protein) na jadernou membránu. RanGAP aktivuje RanGTPázu, která je nezbytná pro transport nákladu z jádra. Místo toho, rostliny pro ukotvení RanGAP využívají WIP (z angl. WPP-domain interacting protein) a WIT (z angl. WPP domain-interacting tail-anchored protein), nukleoporiny s motivem coiled-coil a

transmembránovým motivem. Imunolokalizační analýzy ukázaly lokalizaci WIP a WIT v NPC (Zhao a kol. 2008).

Struktura NPC je mezi organismy konzervovaná, podjednotky póru vytvářejí kanál s osmičetnou radiální symetrií, který lze rozdělit na tři části: jaderný koš, centrální pór/kanál a cytoplazmatická vlákna. Až třetina nukleoporinů obsahuje doménu s FG repeticí, která je důležitá pro vazbu transportních receptorů (Ryan a Wente 2000), ale jen málo nukleoporinů obsahuje transmembránovou doménu. Jako kotva a lešení pro skládání jaderného póru zřejmě slouží integrální proteiny gp210 (Glykoprotein o velikosti 210 kD), Pom121 (z angl. Pore membrane protein of 121 kD) a NDC1 (z angl. Nuclear division cycle 1) (Cronshaw a kol. 2002, podle Tamura a kol. 2010).

Jako takové lze nukleoporiny rozdělit do tří skupin. Prvními jsou FG nukleoporiny obsahující doménu s FG repeticí interagující s přepravovaným nákladem a vytvářející řetězce, skrz které neprojdou velké hydrofilní látky, mimo těch nesoucích exportní faktor interagující s FG doménou. Druhými jsou nukleoporiny s WD (tryptofan-aspartát) repeticí a β -propeller motif (Cronshaw a kol. 2002). Třetí skupinu zastupují transmembránové nukleoporiny, které uchycují NPC v jaderné membráně.



Obr. 2. Porovnání mezi komplexem jaderného póru vyšších rostlin a obratlovců; rostlinné nukleoporiny, které nebyly v práci Tamura a kol. (2010) pozorovány, jsou vyškrtnuty. (Převzato z Tamura a kol. 2010)

Detaily struktury a morfologických změn NPC v různých fázích vývoje byly zaznamenány u tabákových buněk BY-2 (Fišerová a kol. 2009). NPC tři dny starých BY-2 buněk se v určitém rozsahu podobaly NPC popsaných ve vajíčkách drápatky vodní a projevovaly rozmanité a komplexní konformace. Především, u tři dny starých BY-2 buněk bylo pozorováno osm podjednotek cytoplasmatického prstence uspořádaných do kruhu nebo tvaru hvězdice s přítomností nebo nepřítomností centrální partikule uprostřed NPC. U buněk starých deset dní byly kromě podjednotek prstence pozorovatelné vystupující vnitřní vlákna a daleko komplexnější struktura centrálního kanálu. Vnitřní vlákna jsou 5-13 nm silná propojující NPCs a představují důležitý poznatek ohledně struktury rostlinných NPCs. Tyto NPCs z 10 dní starých buněk reprezentují zralé, plně funkční NPC. Cytoplasmatická vlákna nebyla pozorována. To buď znamená, že jsou tyto vlákna obtížně zachovatelná, nebo ne každý rostlinný NPC vlákna obsahuje.

3.2 Translokace mRNP komplexem jaderného póru

Poté, co je mRNA opatřena hnRNP, exportními faktory sestřihového aparátu a dalšími mRNA vazebnými proteiny, následuje sled událostí a interakcí, které vedou k translokaci mRNP částice komplexem jaderného póru. U živočichů a kvasinek byly způsoby exportu již dříve poměrně dobře objasněny, u rostlin však některé komponenty nebyly nalezeny, nebo byly naopak nalezeny faktory unikátní jen pro rostliny.

Na exportu mRNA do cytoplazmy se podílí mnoho proteinů, z nichž většina je do komplexu mRNP rekrutována během transkripce. Faktorů zodpovídajících za export mRNA je celá řada, od CBP (Cap vazebného proteinu), součástí sestřihového aparátu a poly(A) konce, až po exportní receptory a adaptéry zprostředkovávající vazbu receptorů s mRNA. Dobře probádanými systémy jsou savci a kvasinky, ale u rostlin je situace odlišná. V rostlinách nebyly dle sekvenční podobnosti nalezeny homology exportních receptorů, což může znamenat, že rostliny využívají buď jiných způsobů, nebo produkují jiné proteiny s obdobnou funkcí. Některé rostlinné proteiny vykazující podobnost s proteiny obratlovců a kvasinek (především PABP) však mají funkci při exportu v jiných systémech než rostlinných a tedy lze předpokládat podobnou funkci i u rostlin. Na to poukazuje fakt, že export transkriptů, jejichž poly(A) konec, sloužící jako substrát pro určité RNA vazebné proteiny, nebyl správně utvořen, je defektní (Huang a Carmichael 1996).

Všeobecně je u vyšších eukaryot situace následující. Jaderný export mRNA je usnadňován tzv. NTR (z angl. Nuclear transport receptor), mezi něž patří heterodimer

TAP (z angl. Tip-associated protein) všeobecně zvaný NXF1 (z angl. Nuclear RNA export factor 1) a p15, všeobecně NXT1 (z angl. NTF2-like export factor 1), které dohromady tvoří základní komponenty jaderného exportu mRNA. U kvasinek se těmito proteinům říká Mex67 a Mtr2. Zajímavé je, že Mtr2 a p15 i přes absenci sekvenční homologie vykazují strukturní i funkční podobnost (Fribourg a Conti 2003). To podporuje hypotézu psanou výše, že i rostliny mohou mít podobné exportní systémy i přes rozdílnost sekvencí. Situace ohledně rostlinných exportních faktorů bude objasněna dále.

Společným znakem TAP, p15 a jim přidružených proteinů je obsah NTF2-like domény, která je důležitá pro protein-protein interakce (Suyama a kol. 2000) a pro interakci s FG repetitivy jaderných pórů (Fribourg a kol. 2001). P15 je malým proteinem obsahujícím pouze NTF2-like doménu, na rozdíl od NTF2 však netvoří homodimery a neinteraguje s RanGDP. Váže se pouze na TAP, který obsahuje jak NTF2-like doménu, tak RRM pro vazbu RNA, repetice bohaté na leucin a TAP-C doménu.

Dalšími součástmi exportní mašinerie jsou adaptérové proteiny komplexu THO-TREX. NXF1 a NXT1 se váží na mRNA skrze ALY protein (u kvasinek Yra1)- součást EJC. ALY též váže Cbp20 (Iglesias a kol. 2010), což poukazuje na důležitost úprav pre-mRNA pro zdárný export z jádra do cytoplazmy. Důležitým exportním faktorem je UAP56 (u kvasinek Sub2) ATP-dependentní RNA helikáza a součást spliceosomů, která se váže na stejnou doménu ALY jako NXF1-NXT1. V práci Strässera a Hurta (2001) je u kvasinek demonstrována kompetice Mex67-Mtr2 a Sub2 při vazbě na Yra1. Získané poznatky poukazují na to, že helikáza Sub2 by mohla rekrutovat Yra1 na mRNA a poté být vyvázána heterodimerem Mex67-Mtr2, který dále interaguje s jadernými póry. Při translokaci jaderným pórem je potřeba remodelace mRNP, čehož se z cytoplazmatické strany účastní ATP-dependentní helikáza Dbp5p (Tran a kol. 2007).

U rostlin se zatím o exportních faktorech příliš neví, ortology exportních receptorů NXF1 a NXT1 nebyly nalezeny. Jako rostlinný exportní receptor pro některé mRNP by mohl sloužit protein CRM1. CRM1 zprostředkovává export SR proteinů, které rozeznávají určité motivy v sekvenci mRNA a váží se na ni. SR proteiny, které měly mutantní RNA vazebný motiv nebyly v rostlinách exportovány (Rausin a kol. 2010). CRM1 interaguje s FG repetitivy nukleoporinů a doprovází ho RanGTP (Port a kol. 2015). U rostlin by tedy mohla být RanGTP závislá dráha jednou z exportních drah mRNA.

Zajímavým je u rostlin gen LOS4 kódující protein, který je dosud nejpravděpodobnějším ortologem kvasinkového Dbp5p (Gong a kol. 2005). LOS4,

rostlinná DEAD-box helikáza/ATPáza, interaguje s LNO1 (nukleoprin, homolog k savčímu NUP214 a kvasinkovému Nup159) (Braud a kol. 2012). Dalšími proteiny podílejících se na exportu mRNA nejbližší proteinům savců a kvasinek jsou proteiny čepičky vazebného komplexu. Tyto provázejí mRNP až do cytoplazmy, kde jsou vyvážány a importovány zpět do jádra (Lewis a Izaurralde 1997). Jak už bylo zmíněno, také PABP se účastní exportu. Kromě kontextu s vazbou CBC-ALY se ukazuje jeho role v exportu také vztahem s Gle2p (protein asociovaný s NPC) a Nab2p (transportní hnRNP), kdy ektopická exprese rostlinného PAB3 uchránila *nab2-1* mutantní kvasinky od defektu exportu (Chekanova a Belostotsky 2003). Adaptéry ALY jsou u rostlin známy čtyři (Uhrig a kol. 2004).

4. Transport mRNA cytoplazmou

Aktivní transport mRNA a její lokalizovaná translace zajišťuje prostorovou organizaci proteinů v buňce a je tedy nedílnou součástí růstu a vývoje organismu. mRNA jsou naváděny do různých kompartmentů/organel způsobem, na němž se podílejí *cis* elementy nacházející se především v 3' UTR (z angl. Untranslated region) mRNA, tzv. zip kódy, *trans* faktory - RNA vazebné proteiny vážící se na *cis* elementy, a adaptérové proteiny propojující RBP s motorovým proteinem. Posun podél vláken cytoskeletu je zprostředkován motorovými proteiny. Pro rozeznání mRNA příslušným RNA vazebným proteinem je nutný obsah zip kódu. Ten se nachází převážně v 3' UTR oblasti (nebo v kódující oblasti jako např. u ASH1 mRNA), ale může také být v 5' UTR, přičemž struktura zip kódu není zcela daná. Posun podél cytoskeletu byl nejprve pozorován pouze v přítomnosti RNA vazebného proteinu (u kvasinek She2p), to by znamenalo, že pohyb je podmíněn vazbou nákladu (Krementsova a kol. 2011), ačkoliv v práci Heyma a kol. (2013) je tato hypotéza zpochybněna pozorováním pohyblivých částic i bez navázané RNA.

Pohyb mRNA může být propojen s transportem membránových kompartmentů, jako například s endoplazmatickým retikulem (Aronov a kol. 2007), endozómy (Baumann a kol. 2013) nebo processing bodies (Steffens a kol. 2014) a kromě aktinového cytoskeletu je pro transport mnohých mRNA v různých organismech využíváno také mikrotubulů (Baumann a kol. 2013; Brendza a kol. 2000; Donlin a kol. 2016).

4.1 Složení mRNP a transport buňkou

4.1.1 *Cis*- elementy mRNA - zip kódy

Zip kód může být segment mRNA různé délky s definovanou nukleotidovou sekvencí nebo s krátkými repeticemi, ale může tvořit i sekundární struktury (Gonzalez a kol. 1999), kdy je rozeznávaná struktura, ne sekvence. Molekula mRNA může obsahovat i více zip kódů najednou a jejich délka je u různých druhů mRNA odlišná, například mRNA pro β -aktin má zip kód dlouhý 54 nukleotidů lokalizovaný v 3'UTR (Chao a kol. 2010), zatímco zip kód VLE růstového faktoru drápatek Vg1 mRNA je dlouhý až 340 nukleotidů, taktéž se nachází v 3' UTR a jeho schopnosti lokalizovat transkripty se využívá při vytváření konstruktů určených ke sledování lokalizace RNA *in vivo* (Powrie a kol. 2015). U rostlin jsou nejvíce studovanými lokalizované mRNA proteinů endospermu

rýže. Například u mRNA glutelinu byly identifikovány 3 zip kódy s konzervovanými sekvenčními motivy (Washida a kol. 2009). Dva se nacházejí v kódující oblasti a jeden v 3'UTR. To opět ukazuje, že zip kódy nejsou zcela definovány a že sestávají z různých kombinací *cis*-elementů, kdy záleží na druhu mRNA a místě, kam má být transportována.

4.1.2 Transportní komplexy a způsoby transportu u eukaryot

Z výsledků práce Hamady a kol. (2003) vyplývá, že aktivní transport mRNA prolaminů u rostlin je zprostředkován formou pohyblivých mRNP částic závislých na aktinových mikrofilamentech. Také u EDTA/puromycin rezistentní frakce mRNP v pylových láčkách tabáku byla zjištěna asociace s aktinovým cytoskeletem (Honys a kol. 2009). Složení transportních komplexů a interakce mezi mRNP a motorovými proteiny jsou u rostlin málo prozkoumané, z toho důvodu budou zúčastněné proteiny a mechanismy transportu mRNA po aktinovém cytoskeletu popsány na kvasinkové ASH1 mRNA.

Pohyb mRNP u kvasinek je nejprozkoumanějším a je zajištěn komplexem SHE (z angl. Swi5p-dependent HO expression) složeného z RNA vazebného proteinu, adaptéru a molekulárního motoru. Součástími transportního komplexu SHE, který kromě ASH1 transportuje dalších přibližně 30 transkriptů (Shepard a kol. 2003; Aronov a kol. 2007), jsou: myosinový motor Myo4p (myosin třídy V), adaptér She3p a RNA vazebný protein She2p, který je na mRNP rekrutován během transkripce elongačním faktorem RNA polymerázy II DSIF (interaktor NELF podílející se na pozastavení transkripce, viz kapitola 2.1.1) (Shen a kol. 2010). Tyto tři proteiny s navázanou mRNA jsou dostačující pro vytvoření pohyblivé částice pohybující se podél aktinových vláken do nově pučící kvasinky (Heym a kol. 2013).

RBP She2p se na ASH1 váže kotranskripčně, na všechny čtyři zip kódy s různou afinitou, nejvíce však na E3 element situovaný v 3' UTR (Müller a kol. 2011). Celkově je ale afinita a specifita vazby She2p na mRNA pro zdárný transport velice nízká a tento problém je zřejmě řešen vazbou faktoru pro skládání velké ribozomální podjednotky Loc1p, který specifitu a sílu vazby She2p na mRNA výrazně posiluje (Niedner a kol. 2013). Pouze She2p sprovází mRNA cytoplazmou a pro tento jev se nabízí dvě vysvětlení- buď reimport Loc1p do jádra je dostatečně silný na to, aby strhnul tento protein z mRNA, nebo je z mRNA aktivně vyvázán jiným proteinem. Z výsledků práce Niednera a kol. (2013) vychází najevo, že se do komplexu váže protein She3p, čímž

vzniká komplex She2p-She3p a dochází ke kompetici mezi She3p a Loc1p o vazbu na She2p a následnému vyvázání Loc1p. V jádře se na mRNA ještě váží translační regulátory/represory Puf6p a Khd1p (Deng a kol. 2008; Irie a kol. 2002), které zajistí, aby translace nastala až po dopravení a ukotvení mRNP v cílové lokaci.

Další součástí transportního komplexu SHE je zmíněný adaptérový protein She3p, který je v podobě dimeru schopen tvořit stabilní komplex s monomerem Myo4p (Heym a kol. 2013). Vazba je silná a vzniká jednohlavý komplex motorového proteinu a She3p. Dva Myo4p-She3p komplexy jsou rekrutovány mRNA vazebným tetramerem She2p za vzniku dvouhlavého komplexu (Krementsova a kol. 2011). Vazebné místo She3p je jeden α -helix a na She2p se váže pod pravým úhlem. Jak bylo řečeno, náklad RNA není pro pohyb SHE komplexu nutný. Esenciální pro transport komplexu je interakce She3p s She2p. U mutantů She2p, kdy mutantnímu proteinu chyběla vyčnívající doména s motivem helix E a tudíž nebyl schopen vázat She3p, nebyl pohyb částic po F-aktinu pozorován (Heym a kol. 2013). Aktivita SHE bez nákladu mRNA byla poté opět potvrzena, závisí tedy na protein-proteinových interakcích (Edelmann a kol. 2015).

Třetí zmíněnou komponentou SHE je Myo4p, myosinový motor třídy V, sestávající z N-terminální motorové domény, ramena s regulační funkcí a koncové domény. Koncová doména obsahuje coiled-coil region a C-terminální globulární doménu (viz Reck-Peterson a kol. 2000). Právě globulární doména je zodpovědná za správný transport nákladu a jeho lokalizaci v nově pučících kvasinkách (Heuck a kol. 2010)

I když je SHE komplex transportním systémem mRNA pouze u kvasinek, princip, kdy je mRNA transportována pomocí RBP, adaptéru, motorového proteinu a popřípadě pomocí transportu membránového kompartmentu, platí i u dalších organismů (viz Jansen a kol. 2014). Například u *Ustilago maydis* slouží jako RNA vazebný protein Rrm4, který zprostředkovává vazbu s endozómem. Není jisté, zda se Rrm4 váže přímo na endozomální lipidy, nebo zda k tomu potřebuje adaptér (Baumann a kol. 2012). Transport mRNA v rostoucích hyfách může představovat jeden z příkladů transportu závislého na mikrotubulech. Přepravovaná mRNA je v tomto případě vázána skrze Rrm4 na endozóm a pohyb je zprostředkován molekulárními motory kinesinem a dyneinem, kdy dva až pět Kin3 proteinů transportuje náklad k plus konci mikrotubulů a dynein Dyn1-Dyn2 je zodpovědný za transport k minus konci. Kotransport mRNP a endozomů by mohl probíhat dvěma mechanismy, buď molekulární motory obsahují jednu doménu pro vazbu Rrm4 a jednu pro vazbu endozómu (jako například lipid-vazebnou PH doménu u

Kin3), nebo se Rrm4 s naloženou mRNA váže na endozóm pomocí adaptérového proteinu a je transportován společně s ním (Baumann a kol. 2012). Nebyly nalezeny práce, které by popisovaly způsob transportu mRNA pomocí endozomů v rostlinných systémech.

Další alternativy transportu mRNA lze nalézt u živočichů. Ve vajíčku *Drosophila melanogaster* je za determinaci předozadní osy zodpovědná lokalizace *bicoid* mRNA a *oskar* mRNA. *Bicoid* mRNA je lokalizována na přední straně vajíčka (Chang a kol. 2011) a *oskar* mRNA je transportována na stranu zadní a je ukotvena pomocí kontrolního elementu vážícího se do 5' UTR (Kanke a MacDonald 2015). Pohyb po mikrotubulech směrem k plus konci zajišťuje kinesin I, zatímco transport mRNP částic k minus konci mikrotubulů zprostředkovává dynein. Velký rozdíl oproti předešlým uváděným typům mRNA je komplexnost mRNP částice, především přítomnost EJC a množství *trans*-faktorů. Mezi ty patří například Stauf protein (Stau), zodpovědný za směřování transkriptů, hnRNP Hrp48 a Squid-zřejmě zodpovědné za organizaci gradientu dorzálního morfogenu (string-db.org), Glorund (Glo)-vážící proteiny CBC komplexu, a mnoho dalších (viz St Johnston 2005). Jestli tyto RNA vazebné proteiny hrají přímou roli v transportu ale není jasné, žádné z nich nebyly v interakci s dyneinem pozorovány. Nejpravděpodobnějšími kandidáty pro tento účel by mohly být proteiny Egl a BicD. Komplex Egl-BicD by se mohl chovat jako pojítko mezi mRNP a transportní mašinerií (Mach a Lehmann 1997). To bylo potvrzeno v práci Dienstbiera a kol. (2009), kdy byla pozorována přímá interakce Egl, jenž váže mRNA přes zip kód, s BicD, přičemž Egl interaguje s Dlc (z angl. Dynein light chain) doménou dyneinu (Hoogenraad a kol. 2003) a BicD je schopen rekrutovat dynein/dynaktinový komplex (Navarro a kol. 2004). Práce Simona a kol. (2015) uvádí funkci součástí EJC také při lokalizaci *oskar* mRNA, kdy se EJC váže na lokalizační element SOLE. Proteiny tvořící „exon-junction complex“-Y14 (Hatchet a Ephrussi 2001), Mago-nashi (Mohr a kol. 2001) a eIF4A-III (Palacios a kol. 2004) jsou potřebné k transportu a lokalizaci *oskar* mRNA, avšak neví se, jakým mechanismem je tento děj zprostředkován. V neuronech octomilek jsou známy i další součásti transportních mRNP (viz Hutten a kol. 2014), hlavně FMRP (z angl. Fragile X mental retardation 1 protein), kdy v neuronech, které obsahovaly defektní FMRP, byl pozorován omezený směřovaný pohyb mRNP granulí, ale ne celková délka nebo rychlost transportu (Estes a kol. 2008). V jejich modelu transportu mRNP figuruje FMRP jako pojítko mezi mRNA a mikrotubulárními motory a to buď přímo, nebo přes další součásti mRNP, které nejsou známy.

Případy, kdy byla mRNA transportována a lokalizována do specifického místa, byly zjištěny i u dalších organismů. U vajíček *Xenopus laevis* byla *in vivo* pozorována lokalizace vegetativní RNA (Bauermeister a kol. 2015). Ve stejné práci byla zjištěna funkce proteinu Celf1 jako součásti lokalizační mašinerie, který je jinak známý tím, že se podílí na deadenylaci mRNA. Lokalizace mRNA byla pozorována i v blastomerách ovčích embryí (Hosseini a kol. 2016) a v axonech u lidí (Gervasi a kol. 2016). Lokalizovaná mRNA byla pozorována v presynaptických zakončeních axonů a analýza mRNA vázaných na polyzomy odhalila sledovanou mRNA. To je v souladu s potřebou urychlit proteosyntézu neurotransmiterů transportem a lokalizací mRNA do okolí membrány presynaptického zakončení neuronu. Ve stejné práci byl také identifikován element zodpovědný za lokalizaci nacházející se v 3'UTR.

4.2 Transport mRNA u rostlin

Je známo, že mRNA se v buňkách může pohybovat volnou difuzí, být aktivně transportována a lokalizována a že mezi těmito cykly ukotvení, difuze a aktivního transportu je schopna často přecházet (Fusco a kol. 2003). Otázky vyvstávají především ohledně aktivního transportu, u něhož je složení transportních komplexů a mechanismus dodnes u rostlin velmi slabě probádaným. Současný výzkum lokalizace a pohybu mRNA v rostlinných buňkách je zaměřen na mRNA v pylových láčkách u tabáku (Honys a kol. 2009) a mRNA zásobních proteinů semen rýže, hlavně prolaminů (Yang a kol. 2014), a jim podobných proteinů (prolamin-like), například glutelinu (Doroshenk a kol. 2014).

Transport mRNA u rostlin probíhá, stejně jako u předešlých zmíněných organismů, za pomoci buněčného cytoskeletu. U prolaminů endospermu semene rýže byla pozorována RNA vazebným proteinem fúzovaným s GFP značená mRNA lokalizovaná do kortikálního endoplazmatického retikula (Hamada a kol. 2003). Zkoumaná mRNA byla transportována ve formě 0.3-2 μm velkých partikulí průměrnou rychlostí 0.3-0.4 $\mu\text{m/s}$, což ukazuje na možnou účast molekulárních motorů. Transportované částice vykazovaly jednosměrný "stop-and-go" pohyb, ale byl pozorován i oboustranný a náhodný pohyb mRNP. Ve stejné práci bylo pozorováno rychlé pozastavení transportu částic po přidání inhibitorů tvorby mikrofilament, ale přidání látek narušujících mikrotubuly nemělo na pohyblivost téměř žádný vliv. Aktivní transport některých mRNA v rostlinných buňkách by tedy mohl být přednostně závislý na aktinovém cytoskeletu. U *Arabidopsis* bylo identifikováno 17 myosinů spadajících pouze do skupiny VIII a XI, které jsou mezi rostlinami konzervované (Reddy a Day 2001). Třída

myosinů XI je podobná myosinům třídy V (viz Li a Nebenführ 2008), do které spadá i kvasinkový Myo4p.

Kromě aktinových mikrofilament interaguje mRNA také s mikrotubulárním cytoskeletem. Prozatím však poznatky poukazují na to, že mikrotubuly slouží spíše k ukotvení mRNA v cílovém regionu (Muench a Park 2006). V proteomické analýze Chuong a kol. (2004) byly u *Arabidopsis* identifikovány RNA-vazebné proteiny interagující s tubulinem. Jedním z nich je protein s SNC/Tudor doménou, který váže jak tubulin, tak RNA. Dalšími RBP vážící mikrotubuly indentifikovanými v práci Chuong a kol. (2004) jsou RNA helikázy a Poly (A) vazebné proteiny (PABP). Bylo identifikováno také několik proteinů náležících komplexu snRNP, které hrají roli v sestřihu pre-mRNA, a ačkoliv přímá vazba k mikrotubulům nebyla pozorována, sekvence dvou z těchto proteinů je z 50% stejná jako u houbových β -transducinů, které mikrotubuly váží.

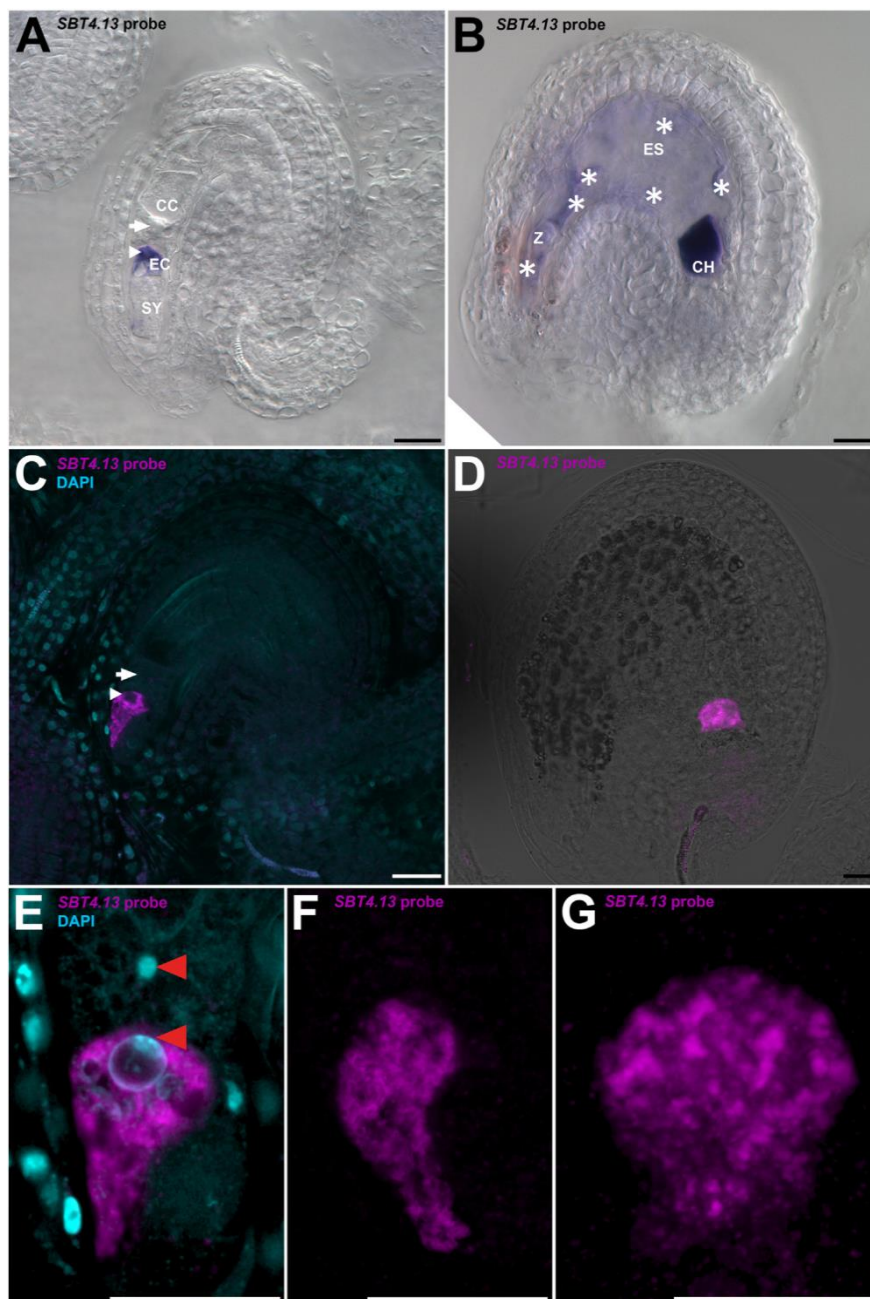
Jak bylo řečeno, mRNA je všeobecně v organismech transportována ve formě mRNP. U rostlin je zatím přesné složení transportovaných mRNP neznámé, ale některé proteiny jsou možnými kandidáty. Mimo výše zmíněných RNA helikáz, PABP a proteinů s SNC/Tudor doménou byla prokázána účast při lokalizaci například u proteinu MFP (z angl. Multifunctional protein), který se také podílí na β -oxidaci mastných kyselin v peroxizómu (Chuong a kol. 2002). Podobným RNA vazebným proteinem u savců je MAP1A, u kterého se ví, že je součástí mRNP komplexu vážícího se na cytoskelet a hraje roli v transportu mRNA (DeFranco a kol. 1998), a tedy MFP by mohl být jednou ze základních součástí transportovaných mRNP u rostlin (Chuong a kol. 2002). Další součástí transportovaných cytoplazmatických mRNP je EJC komplex. I u rostlin byly identifikovány proteiny Mago a Y14 (Yang a kol. 2016), které se podílejí na lokalizaci mRNA ve vajíčkách *Drosophila melanogaster*.

4.3 Lokalizace mRNA u rostlin

V posledních letech byly vyvinuty nové metody sledování mRNA v rostlinných tkáních, které umožnily rychlé a citlivé zjištění lokalizace RNA (Schönberger a kol. 2012; Bowling a kol. 2014; Bleckamnn a Dresselhaus 2016). V práci Doroshenk a kol. (2014) byly v endospermu semene rýže pozorovány protilátkami značené RBP-P, které váží mRNA. RBP-P byly pozorovány v cytoplazmě a především v okolí jádra v endoplazmatickém retikulu. Dále byly pozorovány značené processing bodies a lokalizace transkriptů byla zaznamenána v doménách endoplazmatického retikula endospermu rýže (Washida a kol. 2012). Také v práci Yanga a kol. (2014) byla mRNA

při pozorování exprese RBP lokalizována. V práci Bowling a kol. (2014) byla pozorována mRNA v listech kukuřice. mRNA byla lokalizována především v okolí cévních svazků a v pochvě cévního svazku. V buňkách pokožky listu tabáku byla v reálném čase pozorována lokalizace mRNA do granulí, které se pohybovaly orientovaným pohybem (Schönberger a kol. 2012).

Metodou F-WISH (z angl. fluorescent whole-mount RNA *in situ* hybridization) byly ve vaječných buňkách *Arabidopsis* sledovány mRNA genu pro subtilázu (*SBT4.13* mRNA) (Bleckmann a Dresselhaus 2016). Po oplodnění vajíčka *SBT4.13* mRNA ze zygoty zmizely a místo toho byly detekovány v raném endospermu v oblasti chalázy (viz Obr. 3).



Obr. 3. Příklady ukazující lokalizovanou *SBT4.13* mRNA v raném endospermu poblíž chalázy. (A a B) Pozorovaná mRNA v samičím gametofytu (A) a vyvíjejícím se zárodečném vaku (B). Jádra endospermu jsou označena hvězdičkou. (C-G) Pozorováno použitím metody F-WISH. (C-E) Lze pozorovat stejnou distribuci mRNA v cytoplazmě vaječné buňky. (F) Distribuce mRNA v cytoplazmě při maximálním flouorescenčním signálu (D) mRNA v cytoplazmě syncytia vyvíjejícího se endospermu obklopující jádro v oblasti chalázy. (G) Fotografie D při maximální intenzitě. mRNA vykazuje místa, ve kterých se hromadí.

Zkratky: EC, vaječná buňka; CC, centrální buňky; SY, synergida; Z, zygoty; ES, endosperm; CH, oblast chalázy; bílá šipka: jádro centrální buňky; bílý hrot šipky: jádro vaječné buňky; červené hroty šipek: jádra spermatických buněk po splnutí buněk. Měřítka mají 20 μm (převzato z Bleckmann a Dresselhaus 2016)

5. Skladování mRNA

I přes obecné očekávání, mRNA nemusí být okamžitě rekrutována na polyzomy k translaci, ani degradována ihned po jejich opuštění, ale může mezitím někde setrvávat a být poté, převážně za stresových situací nebo dějů vyžadujících rychlou mobilizaci, opět povolána. Značná část mRNA je po lokalizaci translatována, ale některé transkripty jsou translačně umlčeny a přesměrovány do skladovacích mRNP částic, stresových granulí nebo mohou projít processing bodies, kde jsou buď degradovány a recyklovány, nebo opět umlčeny, skladovány a následně exportovány k opětovné translaci. Například u *Arabidopsis* bylo popsáno více než 12 000 skladovaných mRNA (Nakabayashi a kol. 2005).

5.1 Processing bodies

Processing bodies jsou dynamické komplexy obsahující transkripty, které nejsou momentálně translatovány, proteiny degradačního aparátu mRNA, proteiny zodpovědné za NMD (z angl. Nonsense mediated decay) a komponenty represní mašinerie miRNA. PB (Processing bodies) sestávají z mRNP a skládají se do větších útvarů pomocí protein-proteinových interakcí. Počet PB v buňce a jejich velikost je za různých podmínek variabilní a k jejich skládání je vyžadována přítomnost RNA (Teixeira a kol. 2005).

Protože převážná část proteinů tvořících PB slouží k degradaci mRNA, v krátkosti bude tento děj popsán. Například u kvasinek degradace mRNA začíná deadenylací, kdy je poly(A) konec transkriptu zkracován ribonukleázou vážící se na 5' čepičku. Deadenylovaná mRNA je primárním substrátem pro odebrání 5' čepičky tzv. „decapping“ komplexem složeným z proteinů DCP1 a DCP2. Tato mRNA je poté cílem 5'-3' exoribonukleázy Xrn1p. Alternativně, mRNA může být degradována směrem 3'-5' tzv. exozómem (viz van Hoof a Parker 1999).

V rostlinných PB byly identifikovány následující proteiny: odčepičkující proteiny DCP1, DCP2 a DCP5, u kterého byla prokázána schopnost potlačovat translaci a je nutný k formaci PB (Xu a Chua 2009). Dalšími součástmi PB jsou VCS (VARICOSE), taktéž součást odčepičkujícího komplexu, XRN4- 5'-3' exoribonukleáza a DHH1 helikáza. Toto základní složení proteinů naznačuje funkci PB- represe translace a degradace netranslatovaných transkriptů. To by mohlo probíhat následovně, DCP1, DCP5 a popřípadě DHH1 vytvoří mRNP s cílovou mRNA určenou k umlčení, DCP2 a

VCS odštěpí čepičku z mRNA a ta se stane terčem XRN4, která ji degraduje (Xu a Chua 2011). Faktor pro NMD - UPF1 byl také lokalizován v rostlinných PB (nepublikované výsledky Xu a Chua; podle Xu a Chua 2011). U kvasinek byl v PB pozorován také iniciační faktor translace eIF4E, nicméně u rostlin byl tento faktor nalezen pouze ve stresových granulích (Weber a kol. 2008).

Vzhledem ke skladování transkriptů vyvstává otázka. Jaký druh mRNA je v PB určen ke skladování a nikoli k degradaci? Nejčastějšími mRNA skladovanými v PB jsou mRNA zásobních proteinů semen. Suchá semena v PB akumulují velká množství DCP1 a DCP5, což by odpovídalo uchovávání mRNA v PB bez degradace (pouze u DCP2 byla v práci Xu a kol. (2006) prokázána odčepičková aktivita) (Xu a Chua 2011).

PB nejsou statickými strukturami, v buňce jsou transportovány a práce Steffense a kol. (2014) to dokazuje. Bylo zjištěno, že PB interagují s myosiny XI skrze DCP1 a mutanti v myosinu XI-K vykazovali výrazné snížení rychlosti a směřování pohybu PB. Pohyb byl také inhibován současnou expresí DCP1 s koncovými doménami myosinů XI, to vysvětluje kompetici myosinů o náklad, což by vedlo k vyvázání PB od aktinového cytoskeletu.

5.2 Stresové granule

Stresové granule (SG) jsou buněčné agregáty mRNP odvozené od translačního iniciačního komplexu vznikající za stresových situací jako je například tepelný šok, hypoxie, otrávení jedy nebo infekce virem. SG slouží k udržování správné translační kapacity vůči celkové mRNA. Například, během přelití rostliny nastává hypoxie a dochází ke snížení celkové proteosyntézy, kam ale s již vytvořenými transkripty? Ty mohou jako mRNP částice agregovat do stresových granulí, kde jsou skladovány, a po překonání stresu mohou být znovu rychle reasociovat s polyzomy. SG může obsahovat hnRNP, translační iniciační faktory, PABP, ribozomální podjednotky 40S a další RNA vazebné proteiny, například transkripční faktor UBP1. Další pozorovanou komponentou agregující do SG je během hypoxie ektopicky exprimovaný receptor vápenatých iontů a protein CML38, regulátor proteinů účastnících se umlčování genů (Lokdarshi a kol. 2016). V stresových granulích nejsou uchovávány transkripty pro stresové proteiny, jako například HSP70 a HSP90, neboť tyto jsou potřebné při odpovědi na stres.

mRNA je během hypoxie oddělená od translatujících ribozomů pomocí RNA vazebného proteinu UBP1C (patřícího do rodiny UBP1) a následně agreguje do

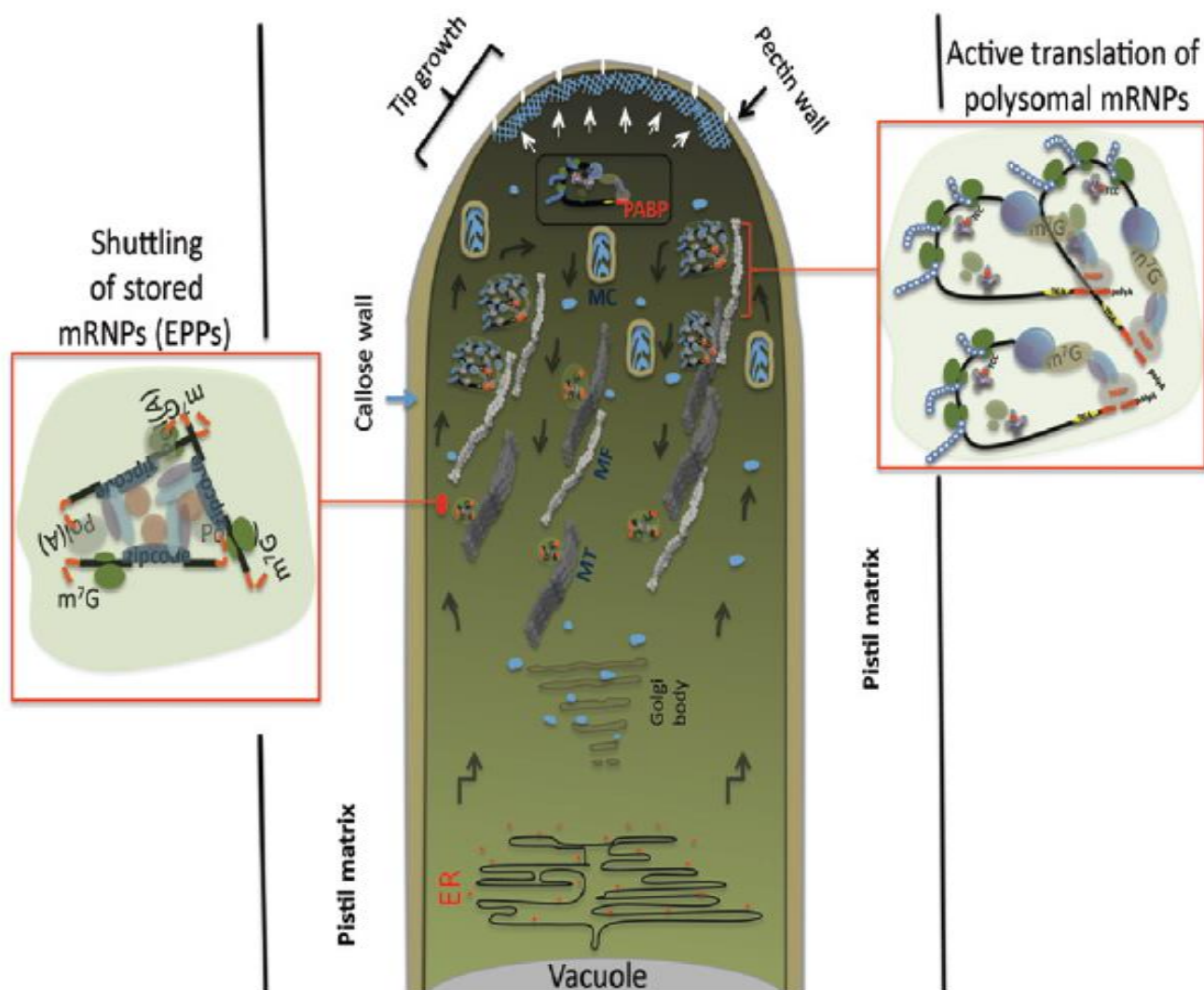
stresových granulí, přičemž substrátem pro UBP1C je jak stabilizovaná, tak destabilizovaná mRNA a celý děj je reverzibilní (Sorenson a Bailey-Serres 2014).

SG jsou sestavovány po fosforylaci α podjednotky iniciačního faktoru translace eIF2, čím se blokuje iniciace translace. Nejprve SG nejsou lokalizovány a jejich distribuce v buňkách je náhodná, ale později dochází k lokalizaci do perinukleárního prostoru (Zhang a kol. 2011). Bylo pozorováno, že stresové granule se objevují už po pěti minutách po vystavení stresu a velikost granulí s časem roste, ale jejich množství po 30 minutách dosáhne maxima a poté už jenom klesá (Ohshima a kol. 2015). Ve stejné práci je potvrzena přítomnost TIA-1 (u rostlin je homologem UBP1) RNA vazebného proteinu jako důležitého faktoru při sestavování SG, pouze 10% buněk s mutantním TIA-1 proteinem vytvořilo při odpovědi na otravu arsenitem stresové granule. Při experimentu byla pozorována fúze dvou SG do jedné větší a tento proces probíhal 10 sekund, to ukazuje, že stresové granule jsou dynamické struktury schopné relativně rychlé remodelace a ke svému složení a transportu vyžadují mikrotubulární cytoskelet, neboť při odebrání mikrotubulů je jejich distribuce v cytoplazmě náhodná. Pohyb SG je zprostředkován dyneinem.

5.3 Translačně inaktivované mRNP a EPPs

Na skladování mRNA a regulaci její translace jsou závislé především systémy s nutností rychlého vývoje po dormantní fázi. Vhodným objektem je pyl kvetoucích rostlin, u kterého je po rehydrataci nutná vyjímečně rychlá produkce strukturních proteinů. Z tohoto důvodu jsou některé transkripty nahromaděny během zrání pylu a skladovány do doby, než bude jejich rychlá translace nutná. U pylu tabáku byly identifikovány volné mRNP se zvyšující se koncentrací během zrání pylu (Honys a Čápková 2000). V této práci je také demonstrováno snižování počtu mRNP a zvyšování množství polyzomů v průběhu růstu pylové láčky, což odpovídá nutnosti mobilizace transkriptů během bouřlivého růstu po rehydrataci pylového zrna. Dále byla v práci Honyse a kol. (2000) zkoumána distribuce *ntp303* mRNA v pylových zrnech tabáku. *ntp303* mRNA byla identifikována ve třech frakcích: v polyzomálních komplexech, v post-polyzomálních RNP částicích a ve velkých RNP částicích odolných vůči ošetření EDTA/puromycinem, tzv. EPP (z angl. EDTA/Puromycin-resistant particles). Zatímco vzorky obsahující alespoň 10% polyzomálních mRNP byly translačně aktivní, EPP nebyly translatovány vůbec. Má se tedy za to, že EPP by mohl být kompartmentem sloužícím k dlouhodobému skladování transkriptů vznikající agregací jednotlivých *ntp303*

mRNP, pravděpodobně za účasti dalších proteinů. Další výzkumy na pylových láčkách tabáku tříbily představu o EPP částicích, ozřejmily především jejich proteinové složení, velikost a funkci (Honys a kol. 2009). Metodou SEC (z angl. Size Exclusion Chromatography) byla zjištěna velikost EPP na více než 8 MDa. V EPP bylo identifikováno 13 ribozomálních proteinů a přítomnost obou hlavních ribozomálních RNA byla potvrzena pomocí RT-PCR, součástí EPP jsou tedy také ribozomální podjednotky. EPP jsou navíc asociovány s cytoskeletem. Přítomnost α -tubulinu, profilinu-3 a aktinu v částicích napovídá, že EPP by mohly být transportovány buňkou podél mikrotubulů a ukotveny aktinovým cytoskeletem (viz Obr. 4). Dříve byla v EPP identifikována pouze pylově specifická *ntp303* mRNA, proto byly testovány i další transkripty, jako například pro iniciační faktory, profilin nebo ADF1 (z angl. Actin depolymerizing factor 1), u kterých byla již dříve zjištěna zvýšená exprese během zrání pylu. Všechny výše zmíněné transkripty byly v EPP odhaleny. Proteomická analýza ukázala obsah 168 proteinů, přičemž 82 bylo identifikováno více než jedním peptidem. Skoro polovina proteinů zahrnovala proteiny metabolismu RNA a proteinů. Dalšími identifikovanými byly proteiny cytoskeletu, protein kinázy a fosfatázy. 25 proteinů zahrnovalo faktory obecného metabolismu a navíc byl identifikován jeden protein účastnící se syntézy prekurzorů buněčné stěny. Tyto poznatky ukazují, že EPP nejsou pouze kompartmentem pro skladování mRNA, ale že se jedná o komplexní systém sloužící také k transportu, zrání, lokalizaci mRNA a syntéze proteinů.



Obr. 4. Znáznornění růstu pylové láčky. Skladované částice (EPP) jsou transportovány k špičce (oblast růstu) po mikrotubulech (MT) a aktinových vláknech (MF) do místa aktivní translace. (MC) mitochondrie. (převzato z Hafidh 2011)

Závěr

Z uvedených experimentálních prací vychází najevo, že aktivní transport a skladování translačně neaktivní mRNA je nedílnou součástí vývoje organismů umožňující časoprostorovou organizaci genové exprese. Faktory, které se transportu mRNA účastní, mají obecně více funkcí, mnohé z nich jsou sestřihovými faktory, nebo proteiny podílející se na stabilitě transkriptu, proto je těžké definovat konkrétní funkce pro konkrétní faktory. Další překážkou k vyjádření jakým způsobem je mRNA transportována u rostlin, je absence detailní znalosti složení transportních komplexů narozdíl od například kvasinek a živočichů, ačkoliv byly pozorovány podobné principy. Z uvedených prací také vychází najevo, že skladování a transport mRNA nastává v určitých fázích vývoje organismů a popřípadě za speciálních podmínek (viz nutnost rychlé aktivace růstu pylové láčky po hydrataci pylového zrna).

V posledních pár letech se výzkum ohledně transportu a lokalizovaném skladování mRNA v rostlinách poměrně rozběhl, ačkoliv experimentální práce jsou spíše popisného charakteru popisující kdy, za jakých podmínek a kam byla mRNA lokalizována, nicméně pochopení mechanismů je lehce opomíjeno.

Osobně jsem zastáncem utopistické představy vědomého řízení vývoje organismů, ke kterému lidstvo směřuje, k čemuž je nezbytností pochopit řízení genové exprese transportem a skladováním mRNA v určitých oblastech buňky. Právě proto jsem si neustále kladl otázku „jak, jakým způsobem, co řídí tento proces“ a domnívám se, že tato práce by mohla být nápomocná i dalším, kteří by chtěli tyto děje lépe pochopit. V budoucnu bych chtěl více rozvinout své poznání ohledně transportu a lokalizace mRNA v rostlinných buňkách a navázat diplomovou prací, která by se zaměřovala na pozorování lokalizace mRNA *in vivo* v pylových láčkách tabáku.

Seznam použité literatury

- Agafonov, D.E., Agafonov, D.E., Kastner, B., Dybkov, O., Hofele, R. V, Liu, W. and Urlaub, H. (2016) Molecular architecture of the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *Science* (80-.), **2085**, 1–11
- Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: From the DNA to the nuclear pore. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 242–250.
- Aronov, S., Gelin-Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E. and Gerst, J.E. (2007) mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3441–3455.
- Bauermeister, D., Claßen, M. and Pieler, T. (2015) A novel role for Celf1 in vegetal RNA localization during *Xenopus* oogenesis. *Dev. Biol.*, **405**, 214–224.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, a. and Feldbrügge, M. (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J. Cell Sci.*, **125**, 2740–2752.
- Baumann, S., König, J., Koepke, J. and Feldbrügge, M. (2014) Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep.*, **15**, 94–102.
- Belostotsky, D.A. (2003) Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: Three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics*, **163**, 311–319.
- Bleckmann, A. and Dresselhaus, T. (2015) Fluorescent whole-mount RNA in situ hybridization (F-WISH) in plant germ cells and the fertilized ovule. *Methods*, **98**, 66–73.
- Bowling, A.J., Pence, H.E. and Church, J.B. (2014) Application of a novel and automated branched DNA in situ hybridization method for the rapid and sensitive localization of mRNA molecules in plant tissues. *Appl. Plant Sci.*, **2**, 1400011.
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., Saxton, W.M. (2000) A function for Kinesin I in the Posterior Transport of *oskar* mRNA and Staufen Protein. *Science*. 289(5487): 2120–2122
- Braud, C., Zheng, W. and Xiao, W. (2012) LONO1 encoding a nucleoporin is required for embryogenesis and seed viability in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **160**, 823–836.
- Burge, C.B., Tuschl, T. and Sharp, P.A. (1999) Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. *The RNA World, Second edition*, **37**, 525–560.
- Coppola, J.A., Field, A.S. and Luse, D.S. (1983) Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 1251–5.
- Cronshaw, J.M. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, **158**, 915–927.
- DeFranco, C., Chicurel, M.E. and Potter, H. (1998) A general RNA-binding protein complex that includes the cytoskeleton-associated protein MAP 1A. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1695–1708.
- Deng, Y., Singer, R.H. and Gu, W. (2008) Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev.*, **22**, 1037–1050.
- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. and Bullock, S.L. (2009) Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev.*, **23**, 1546–1558.
- Donlin-Asp, P.G., Bassell, G.J. and Rossoll, W. (2016) A role for the survival of motor neuron protein in mRNP assembly and transport. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **39**, 53–61.
- Doroshenko, K.A., Tian, L., Crofts, A.J., Kumamaru, T. and Okita, T.W. (2014) Characterization of RNA binding protein RBP - P reveals a possible role in rice glutelin gene expression and RNA localization. , 381–394.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002) Messenger-Rna-Binding Proteins and the Messages They Carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 195–205.
- Edelmann, F.T., Niedner, A. and Niessing, D. (2015) ASH1 mRNP-core factors form stable complexes in absence of cargo RNA at physiological conditions. *RNA Biol.*, **12**, 233–7.
- Estes, P.S., O'Shea, M., Clasen, S. and Zarnescu, D.C. (2008) Fragile X protein controls the efficacy of mRNA transport in *Drosophila* neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, **39**, 170–179.
- Jansen, R., Niessing, D., Baumann, S., Feldbrügge, M., (2014) mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet.*, **30**, 408–417.
- Fiserova, J., Kiseleva, E. and Goldberg, M.W. (2009) Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, **59**, 243–255.
- Fribourg, S., Braun, I.C., Izaurralde, E. and Conti, E. (2001) Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol. Cell*, **8**, 645–656.
- Fribourg, S. and Conti, E. (2003) Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO Rep.*, **4**, 699–703.
- Gallie, D.R. (1991) the Cap and Poly(a) Tail Function Synergistically To Regulate Messenger-Rna Translational Efficiency. *Genes Dev.*, **5**, 2108–2116.
- Geissler, R., Simkin, A., Floss, D., Patel, R., Fogarty, E.A., Scheller, J. and Grimson, A. (2016) A widespread sequence-specific mRNA decay pathway mediated by hnRNPs A1 and A2/B1. *Genes Dev.*, **30**, 1070–1085.
- Gervasi, N.M., Scott, S.S., Aschrafi, A., Gale, J., Vohra, S.N., Macgibeny, M.A., Kar, A.N., Gioio, A.E. and Kaplan, B.B. (2015) The local expression and trafficking of tyrosine hydroxylase mRNA in the axons of sympathetic neurons. , 1–13.

- Golovkin, M. and Reddy, a S.** (1996) Structure and expression of a plant U1 snRNP 70K gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K pre-mRNAs produces two different transcripts. *Plant Cell*, **8**, 1421–35.
- Golovkin, M. and Reddy, A.S.N.** (1999) An SC35-like Protein and a Novel Serine / Arginine-rich Protein Interact with An SC35-like Protein and a Novel Serine / Arginine-rich Protein Interact with Arabidopsis U1-70K Protein *. *The journal of Biological Chemistry*, **274**, 36428–36438.
- Gong, Z., Dong, C.-H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B. and Zhu, J.-K.** (2005) A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 256–67.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B.C., Nasmyth, K. and Ahsen, U. Von** (1999) ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and ASH1 protein translation. *Curr. Biol.*, **9**, 337–340.
- Gupta, J.D., Li, Q., Thomson, B. and Hunt, A.G.** (1995) Characterization of a novel plant poly(A)-polymerase. *Plant Sci*, **110**, 215–226.
- Hafidh, S., Čapková, V., Honys, D.** (2011) CHAPTER mRNP Complexes Tweaking after Transcription. *RNA Infrastructure and Networks*, 118–136.
- Hachet, O. and Ephrussi, A.** (2001) Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr. Biol.*, **11**, 1666–1674.
- Hamada, S., Ishiyama, K., Choi, S.-B., Wang, C., Singh, S., Kawai, N., Franceschi, V.R. and Okita, T.W.** (2003) The transport of prolamine RNAs to prolamine protein bodies in living rice endosperm cells. *Plant Cell*, **15**, 2253–2264.
- Heuck, A., Fetka, I., Brewer, D.N., Hüls, D., Munson, M., Jansen, R.P. and Niessing, D.** (2010) The structure of the Myo4p globular tail and its function in ASH1 mRNA localization. *J. Cell Biol.*, **189**, 497–510.
- Heym, R.G., Zimmermann, D., Edelmann, F.T., Israel, L., ??kten, Z., Kovar, D.R. and Niessing, D.** (2013) In vitro reconstitution of an mRNA-transport complex reveals mechanisms of assembly and motor activation. *J. Cell Biol.*, **203**, 971–984.
- Hofmann, C.J.B., Marshallsay, C., Waibel, F. and Filipowicz, W.** (1993) Characterization of the genes encoding U4 small nuclear RNAs in Arabidopsis thaliana. *Mol. Biol. Rep.*, **17**, 21–28.
- Honys, D. and Čapková, V.** (2000) Temporal changes in the RNA distribution between polysomes and postpolysomal ribonucleoprotein particles in tobacco male gametophyte. *Biol. Plant.*, **43**, 517–522.
- Honys, D., Combe, J.P., Twell, D. and Čapková, V.** (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sex. Plant Reprod.*, **13**, 135–144.
- Honys, D., Reňák, D., Feciková, J., Jedelský, P.L., Nebesářová, J., Dobrev, P. and Čapková, V.** (2009) Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization. *J. Proteome Res.*, **8**, 2015–2031.
- Hoogenraad, C.C., Wulf, P., Schiefermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, J.V., Grosveld, F., Zeeuw, C.I. De and Akhmanova, A.** (2003) Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *EMBO J.*, **22**, 6004–6015.
- Hosseini, S.-M., Moulavi, F., Tanhaie-Vash, N., et al.** (2016) The Principal Forces of Oocyte Polarity Are Evolutionary Conserved but May Not Affect the Contribution of the First Two Blastomeres to the Blastocyst Development in Mammals. *PLoS One*, **11**, e0148382.
- Huang, C.F., Miki, D., Tang, K., et al.** (2013) A Pre-mRNA-Splicing Factor Is Required for RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *PLoS Genet.*, **9**.
- Huang, Y. and Carmichael, G.G.** (1996) Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1534–1542.
- Hunt, A.C.** (1994) Messenger 3' end formation in Plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 47–60.
- Chang, C.W., Nashchekin, D., Wheatley, L., Irion, U., Dahlgaard, K., Montague, T.G., Hall, J. and Johnston, D. St.** (2011) Anterior-posterior axis specification in drosophila oocytes: Identification of novel bicoid and oskar mRNA localization factors. *Genetics*, **188**, 883–896.
- Chao, J.A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S.C. and Singer, R.H.** (2010) ZBP1 recognition of β -actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.*, **24**, 148–158.
- Chekanova, J.A. and Belostotsky, D.A.** (2003) Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA*, **9**, 1476–90.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R. and Buratowski, S.** (1997) mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.*, **11**, 3319–3326.
- Chuong, S.D.X., Mullen, R.T. and Muench, D.G.** (2002) Identification of a rice RNA- and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the β -oxidation of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2419–2429.
- Chuong, S.D.X.** (2004) Large-scale Identification of Tubulin-binding Proteins Provides Insight on Subcellular Trafficking, Metabolic Channeling, and Signaling in Plant Cells. *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 970–983.
- Iglesias, N., Tutucci, E., Gwizdek, C., Vinciguerra, P., Dach, E. Von, Corbett, A.H., Dargemont, C. and Stutz, F.** (2010) Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes Dev.*, **24**, 1927–1938.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K. and Herskowitz, I.** (2002) The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J.*, **21**, 1158–1167.
- Isshiki, M.** (2006) The Serine/Arginine-Rich Protein Family in Rice Plays Important Roles in Constitutive and Alternative Splicing of Pre-mRNA. *Plant Cell Online*, **18**, 146–158.
- Kanke, M. and Macdonald, P.M.** (2015) Translational activation of Oskar mRNA: Reevaluation of the role and importance of a 5' regulatory element. *PLoS One*, **10**, 1–16.

- Kmiecik, M., Simpson, C.G., Lewandowska, D., Brown, J.W.S. and Jarmolowski, A.** (2002) Cloning and characterization of two subunits of Arabidopsis thaliana nuclear cap-binding complex. *Gene*, **283**, 171–183.
- Kong, X., Yang, L., Chen, Q., Xiang, N., Yang, Y. and Hu, X.** (2013) Quantitative Proteomics Analysis Reveals That the Nuclear Cap-Binding Complex Proteins Arabidopsis CBP20 and CBP80 Modulate the Salt Stress Response. *J. Proteom Res.*, **13**, 2495–2510.
- Kotovic, K.M., Lockshon, D., Boric, L. and Neugebauer, K.M.** (2003) Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5768–79.
- Krementsova, E.B., Hodges, A.R., Bookwalter, C.S., Sladewski, T.E., Travaglia, M., Sweeney, H.L. and Trybus, K.M.** (2011) Two single-headed myosin V motors bound to a tetrameric adapter protein form a processive complex. *J. Cell Biol.*, **195**, 631–641.
- Lambermon, M.H., Simpson, G.G., Wiczonek Kirk, D.A., Hemmings-Mieszczak, M., Klahre, U. and Filipowicz, W.** (2000) UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J.*, **19**, 1638–1649.
- Landsberger, M., Lorković, Z.J. and Oelmüller, R.** (2002) Molecular characterization of nucleus-localized RNA-binding proteins from higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 413–421.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X. and Maquat, L.E.** (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: Dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.*, **21**, 3536–3545.
- Lewis, J.D. and Izaurralde, E.** (1997) The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 461–469.
- Li, J.F. and Nebenführ, A.** (2008) The tail that wags the Dog: The globular Tail Domain defines the function of Myosin V/XI. *Traffic*, **9**, 290–298.
- Lin, C. and Patton, J., G.** (1995) Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *RNA*, **1**, 234–245.
- Lokdarshi, A., Conner, W.C., McClintock, C., Li, T. and Roberts, D.** (2015) Arabidopsis CML38, a calcium sensor that localizes to ribonucleoprotein complexes under hypoxia stress. *Plant Physiol.*, **170**, pp.15.01407.
- Loke, J.C.** (2005) Compilation of mRNA Polyadenylation Signals in Arabidopsis Revealed a New Signal Element and Potential Secondary Structures. *Plant Physiol.*, **138**, 1457–1468.
- Lorković, Z.J., Wiczonek Kirk, D.A., Klahre, U., Hemmings-Mieszczak, M. and Filipowicz, W.** (2000) RBP45 and RBP47, two oligouridylate-specific hnRNP-like proteins interacting with poly(A)⁺ RNA in nuclei of plant cells. *RNA*, **6**, 1610–24.
- Lorković, Z.J.** (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci.*, **14**, 229–236.
- Mach, J.M. and Lehmann, R.** (1997) An egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in Drosophila. *Genes Dev.*, **11**, 423–435.
- Maquat, L.E.** (2004) Nonsense-Mediated mRNA Decay: Splicing, Translation And mRNP Dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 89–99.
- Marshall, N.F. and Price, D.H.** (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12335–12338.
- Marshallsay, C., Kiss, T. and Filipowicz, W.** (1990) Amplification of plant U3 and U6 snRNA gene sequences using primers specific for an upstream promoter element and conserved intragenic regions. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3459–3466.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M. and Bentley, D.L.** (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, **385**, 357–361.
- Misra, A., Ou, J., Zhu, L.J. and Green, M.R.** (2015) Global analysis of CPSF2-mediated alternative splicing: Integration of global iCLIP and transcriptome profiling data. *Genomics Data*, **6**, 217–221.
- Mohr, S.E., Dillon, S.T. and Boswell, R.E.** (2001) The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during Drosophila oogenesis. *Genes Dev.*, **15**, 2886–2899.
- Morello, L. and Breviario, D.** (2008) Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genomics*, **9**, 227–38.
- Muench, D., G., Park, N.** (2006) Protein transport in the plant secretory pathway. Special Issue on Plant Cell Biology. *Can. J. Bot.*, **84**, 523–530.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Nambara, E.** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: Epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.*, **41**, 697–709.
- Navarro, C., Puthalakath, H., Adams, J.M., Strasser, A. and Lehmann, R.** (2004) Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. *Nat Cell Biol.*, **6**, 427–435.
- Niedner, A., Müller, M., Moorthy, B.T., Jansen, R.-P. and Niessing, D.** (2013) Role of Loc1p in assembly and reorganization of nuclear ASH1 messenger ribonucleoprotein particles in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, E5049–58.
- Ohshima, D., Arimoto-Matsuzaki, K., Tomida, T., Takekawa, M. and Ichikawa, K.** (2015) Spatio-temporal Dynamics and Mechanisms of Stress Granule Assembly. *PLoS Comput. Biol.*, **11**, 1–22.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., Johnston, D.S. and Izaurralde, E.** (2004) An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, **427**, 753–757.
- Palusa, S.G., Ali, G.S. and Reddy, A.S.N.** (2007) Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: Regulation by hormones and stresses. *Plant J.*, **49**, 1091–1107.
- Park, G.T., Frost, J.M., Park, J.-S., et al.** (2014) Nucleoporin MOS7/Nup88 is required for mitosis in gametogenesis and seed development in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 18393–8.

- Parry, G. (2014) Components of the Arabidopsis nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth. *J. Exp. Bot.*, **65**, 6057–6067.
- Port, S.A., Monecke, T., Dickmanns, A., Spillner, C., Hofele, R., Urlaub, H., Ficner, R. and Kehlenbach, R.H. (2015) Structural and Functional Characterization of CRM1-Nup214 Interactions Reveals Multiple FG-Binding Sites Involved in Nuclear Export. *Cell Rep.*, **13**, 690–702.
- Powrie, E.A., Ciocanel, V., Kreiling, J.A., Gagnon, J.A., Sandstede, B. and Mowry, K.L. (2015) Using in vivo imaging to measure RNA mobility in *Xenopus laevis* oocytes. *Methods*, **98**, 60–65.
- Rausin, G., Tillemans, V., Stankovic, N., Hanikenne, M. and Motte, P. (2010) Dynamic nucleocytoplasmic shuttling of an Arabidopsis SR splicing factor: role of the RNA-binding domains. *Plant Physiol.*, **153**, 273–284.
- Reck-Peterson, S.L., Provance, D.W., Mooseker, M.S. and Mercer, J.A. (2000) Class V myosins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1496**, 36–51.
- Reddy, a S. and Day, I.S. (2001) Analysis of the myosins encoded in the recently completed Arabidopsis thaliana genome sequence. *Genome Biol.*, **2**, RESEARCH0024.
- Ryan, K.J. and Wente, S.R. (2000) The nuclear pore complex: A protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 361–371.
- Shen, Z., St-Denis, A. and Chartrand, P. (2010) Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev.*, **24**, 1914–1926.
- Shepard, K. a, Gerber, a P., Jambhekar, a, Takizawa, P. a, Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L. and Vale, R.D. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 11429–11434.
- Schönberger, J., Hammes, U.Z. and Dresselhaus, T. (2012) In vivo visualization of RNA in plants cells using the λn 22 system and a GATEWAY-compatible vector series for candidate RNAs. *Plant J.*, **71**, 173–181.
- Simon, B., Masiewicz, P., Ephrussi, A. and Carlomagno, T. (2015) The structure of the SOLE element of oskar mRNA. *Rna*, 1–10.
- Simpson, G.G., Clark, G.P., Rothnie, H.M., Boelens, W., Venrooij, W. van and Brown, J.W. (1995) Molecular characterization of the spliceosomal proteins U1A and U2B" from higher plants. *EMBO J.*, **14**, 4540–50.
- Solymosy, F. and Pollák, T. (1993) Uridylate-Rich Small Nuclear RNAs (UsnRNAs), Their Genes and Pseudogenes, and UsnRNPs in Plants: Structure and Function. A Comparative Approach. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, **12**, 275–369.
- Sorenson, R. and Bailey-Serres, J. (2014) Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 2373–8.
- St Johnston, D. (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 363–75.
- Steffens, A., Jaegle, B., Tresch, A., Hülskamp, M. and Jakoby, M. (2014) Processing-body movement in Arabidopsis depends on an interaction between myosins and DECAPPING PROTEIN1. *Plant Physiol.*, **164**, 1879–92.
- Strässer, K. and Hurt, E. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, **413**, 648–652.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H. and Bartel, D.P. (2014) Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, **508**, 66–71.
- Suyama, M., Doerks, T., Braun, I.C., Sattler, M., Izaurralde, E. and Bork, P. (2000) Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep.*, **1**, 53–8.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T. and Hara-Nishimura, I. (2010) Identification and characterization of nuclear pore complex components in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **22**, 4084–4097.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. a, Brengues, M. and Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*, **11**, 371–382.
- Tran, E.J., Zhou, Y., Corbett, A.H. and Wente, S.R. (2007) The DEAD-Box Protein Dbp5 Controls mRNA Export by Triggering Specific RNA:Protein Remodeling Events. *Mol. Cell*, **28**, 850–859.
- Uhrig, J.F. (2004) Relocalization of Nuclear ALY Proteins to the Cytoplasm by the Tomato Bushy Stunt Virus P19 Pathogenicity Protein. *Plant Physiol.*, **135**, 2411–2423.
- Hoof, a van and Parker, R. (1999) The exosome: a proteasome for RNA? *Cell*, **99**, 347–350.
- Vankan, P., Edoh, D., Filipowicz, W. (1984) Structure and expression of the U5 snRNA gene of Arabidopsis thaliana. Conserved upstream sequence elements in plant U-RNA genes. *Nucleic Acids Research*, **12**, 2561–2568.
- Vankan, P. and Filipowicz, W. (1987) U2 snRNA genes of Arabidopsis thaliana and their expression in transfected plant protoplasts. *Mol. Biol. Rep.*, **12**, 150.
- Waibel, F. and Filipowicz, W. (1990) snRNA genes. , **18**, 3451–3458.
- Wang, B.-B. and Brendel, V. (2004) The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol.*, **5**, R102.
- Wang, H., Ramakrishnan, A., Fletcher, S., Prochownik, E. V and Genetics, M. (2015) HHS Public Access. , **2**, 161–167.
- Washida, H., Kaneko, S., Crofts, N., Sugino, A., Wang, C. and Okita, T.W. (2009) Identification of cis-localization elements that target glutelin RNAs to a specific subdomain of the cortical endoplasmic reticulum in rice endosperm cells. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1710–1714.
- Weber, C., Nover, L. and Fauth, M. (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.*, **56**, 517–530.
- Wilusz, C.J., Gao, M., Jones, C.L., Wilusz, J. and Peltz, S.W. (2001) Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *RNA*, **7**, 1416–24.
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W. and Chua, N.-H. (2006) Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell*, **18**, 3386–98.
- Xu, J. and Chua, N.-H. (2009) Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell*, **21**, 3270–9.

- Xu, J. and Chua, N.H.** (2011) Processing bodies and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 88–93.
- Xu, T., Kim, B.M., Kwak, K.J., Jung, H.J. and Kang, H.** (2016) The Arabidopsis homolog of human minor spliceosomal protein U11-48K plays a crucial role in U12 intron splicing and plant development. *J. Exp. Bot.*, erw158.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, a, Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H.** (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41–51.
- Yang, Y., Crofts, A.J., Crofts, N., Okita, T.W., Chemistry, B. and Washington, Y.Y.** (2014) Multiple RNA Binding Protein Complexes Interact with the Rice Prolamine RNA Cis-Localization. , **164**, 1271–1282.
- Yeap, W.C., Namasivayam, P. and Ho, C.L.** (2014) HnRNP-like proteins as post-transcriptional regulators. *Plant Sci.*, **227**, 90–100.
- Zhang, J., Okabe, K., Tani, T. and Funatsu, T.** (2011) Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *J. Cell Sci.*, **124**, 4087–95.
- Zhao, Q., Brkljacic, J. and Meier, I.** (2008) Two Distinct Interacting Classes of Nuclear Envelope-Associated Coiled-Coil Proteins Are Required for the Tissue-Specific Nuclear Envelope Targeting of Arabidopsis RanGAP. *Plant Cell Online*, **20**, 1639–1651.